

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Medizinischen Fakultät Charité der  
Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Molekulargenetische, endokrinologische  
und klinische Untersuchungen bei  
Patientinnen mit Polyzystischem Ovar  
Syndrom und Ovariellen  
Überstimulationssyndrom**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Susanne Müller

aus Leipzig

---

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Lichtenegger  
2. Prof. Dr. med. W. Friedmann  
3. Prof. Dr. med. H. Alexander

Datum der Promotion: 20.01.2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Aufgabenstellung der Arbeit</b>	<b>6</b>
<b>1.2</b>	<b>Polyzystisches Ovar Syndrom (PCOS)</b>	<b>7</b>
1.2.1	Einführung	7
1.2.2	Klinik	7
1.2.3	Morphologie	8
1.2.4	Biochemische Befunde	9
1.2.5	Pathogenese des PCOS	10
1.2.6	Folgeerkrankungen	11
1.2.6.1	Kardiovaskuläre Erkrankungen	11
1.2.6.2	Diabetes mellitus	11
1.2.6.3	Malignome	12
1.2.7	PCOS und Gravidität	12
<b>1.3</b>	<b>Ovariellies Hyperstimulationssyndrom (OHSS)</b>	<b>13</b>
1.3.1	Einführung	13
1.3.2	Klinik	13
1.3.3	Klassifikation	15
1.3.4	Pathogenese und Risikofaktoren	16
1.3.5	Koinzidenz von PCOS und OHSS	16
<b>1.4</b>	<b>21-Hydroxylase</b>	<b>18</b>
1.4.1	Das Enzym 21-Hydroxylase	18
1.4.1.1	Funktion der 21-Hydroxylase	18
1.4.1.2	Klinik des 21-Hydroxylase-Mangels	18
1.4.1.3	Diagnostik des 21-Hydroxylase-Mangels	19
1.4.2	Das Gen <i>CYP 21</i>	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Patientenkollektiv</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Untersuchungsablauf</b>	<b>24</b>
<b>2.3</b>	<b>Klinische Untersuchungen</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Endokrinologische Untersuchungen</b>	<b>26</b>
2.4.1	LHRH-Test	26
2.4.2	ACTH-Test	27
2.4.3	Metabolische Parameter	28
<b>2.5</b>	<b>Genetische Untersuchungen</b>	<b>28</b>
2.5.1	Präparation genomischer DNA	28
2.5.2	Untersuchung der DNA	29
2.5.2.1	Southern-Blot-Analyse	29
2.5.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
2.5.2.3	Sequenzierung	38
<b>2.6</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>41</b>

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse der klinischen und biochemischen Untersuchungen</b>	<b>43</b>
3.1.1	Statistische Grundlagen	43
3.1.2	Klinische Befunde	43
3.1.3	Biochemische Befunde	45
3.1.3.1	LHRH-Test	45
3.1.3.2	ACTH-Test	47
3.1.3.3	Metabolische Parameter	50
3.1.4	Korrelationsanalyse	52
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen</b>	<b>56</b>
3.2.1	Ergebnisse der Southern-Blot-Analyse	56
3.2.2	Ergebnisse des Mutationsscreenings	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse der klinischen und biochemischen Untersuchungen</b>	<b>66</b>
4.1.1	Ziel der Untersuchungen	66
4.1.2	Unterschiede im Hormonprofil zwischen PCOS-Patientinnen und Kontrollen	68
4.1.3	Hinweise auf ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines OHSS	70
4.1.4	Bedeutung der metabolischen Parameter	72
4.1.4.1	Leptin	72
4.1.4.2	Insulin	75
4.1.4.3	Insulin-like growth factor 1	76
4.1.5	Beurteilung der Aussagekraft biochemischer Untersuchungen zur Differenzierung zwischen den Gruppen	77
4.1.6	Beurteilung der Ergebnisse der Blutdruckmessung	80
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen</b>	<b>81</b>
4.2.1	Genetische Untersuchungen im Zusammenhang mit PCOS	81
4.2.1.1	Genetische Modelle	82
4.2.1.2	Kandidatgene	83
4.2.1.3	<i>CYP21A1</i> als Kandidatgen	85
4.2.2	Bedeutung von Pseudogenen	86
4.2.3	Allele des <i>CYP21A2</i> -Gens	87
4.2.4	Diskussion der eigenen genetischen Ergebnisse	93
4.2.5	Genotyp-Phänotyp-Korrelation	95
4.2.6	Methodenkritik	97
4.2.7	Notwendigkeit der genetischen Untersuchung der 21-Hydroxylase	98
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>104</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>112</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>113</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>114</b>

<b>Eigene Publikationen und Kongressbeiträge</b>	<b>115</b>
<b>Patientenaufklärung</b>	<b>116</b>
<b>Einverständniserklärung</b>	<b>118</b>
<b>Verwendete Stammlösungen und Chemikalien</b>	<b>119</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>123</b>
<b>Quelldaten</b>	<b>125</b>
<b>Tabelle A.1 - Verteilung der Polymorphismen</b>	<b>132</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufgabenstellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zur Aufklärung des Zusammenhangs zwischen biochemischen und genetischen Veränderungen des Enzyms 21-Hydroxylase und der Ausprägung eines Polyzystischen Ovar Syndroms (PCOS) leisten. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwieweit sich biochemische Besonderheiten oder Veränderungen der 21-Hydroxylase-Aktivität auf die Entstehung eines Ovariellen Überstimulationssyndroms (OHSS) auswirken können.

In einer Vorarbeit aus unserer Arbeitsgruppe wurden 21 PCOS- Patientinnen auf die zwölf häufigsten im Zusammenhang mit einem Adrenogenitalen Syndrom (AGS) bekannten Punktmutationen des *CYP21A2*-Gens untersucht. Dabei fanden wir bei ca. 19% der Patientinnen eine heterozygote Punktmutation (im Vergleich zu 5-8% in der Normalbevölkerung) einhergehend mit erhöhten 21-Desoxycortisol (21-DOF) bzw. 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron-Werten (17 $\alpha$ - OHP) (1).

Diese Ergebnisse veranlassten uns, die 21-Hydroxylase im Hinblick auf biochemische Funktion und genetische Veränderungen an einem genauer und umfangreicher charakterisierten Patientenkollektiv zu untersuchen. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob eine Subgruppe von PCOS- Patientinnen mit verstärkter Neigung zur Ausbildung eines OHSS durch biochemische Besonderheiten oder eine genetische Veränderung der 21-Hydroxylase identifiziert werden kann.

Dazu sollten ca. 40 PCOS- Patientinnen untersucht werden, von denen ca. 20 in der Anamnese die Entwicklung eines OHSS im Rahmen der assistierten Reproduktion (ART) aufwiesen. Darüber hinaus wurde durch die Untersuchung einer Kontrollgruppe mit identischen Methoden eine Vergleichsgruppe etabliert.

Die Erhebung klinischer Daten und endokrinologischer Parameter im Zusammenhang mit dem LHRH-Test und ACTH-Test diente dem exakten Erfassen der Symptomausprägung bei unseren Patientinnen, um mögliche Korrelationen zwischen genetischen Veränderungen und phänotypischer Ausprägung zu erkennen. Dabei wurde besonderer Wert auf die

Funktionsfähigkeit der 21-Hydroxylase gelegt, als deren sensitivster biochemischer Marker das 21-DOF gilt. Um Hinweise auf metabolische Störungen und mögliche Folgeerkrankungen des Polyzystischen Ovar Syndroms bzw. auf ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Ovariellen Überstimulationssyndroms zu gewinnen, sollten die Werte für den Vascular endothelial growth factor (VEGF), Insulin, den Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), das Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-1) und Leptin im Serum bestimmt werden .

Durch die lückenlose Untersuchung des Genortes der 21-Hydroxylase bei allen Patientinnen sollten bekannte und möglicherweise neue Mutationen oder Polymorphismen aufgedeckt werden.

## **1.2 Polyzystisches Ovar Syndrom (PCOS)**

### **1.2.1 Einführung**

Polyzystische Ovarien sind die häufigste Ursache für weibliche Anovulation und Hyperandrogenämie (2). Dabei ist zu unterscheiden zwischen dem bloßen Auftreten von bilateral vergrößerten polyfollikulären Ovarien im Ultraschall ohne klinische Symptomatik (PCO) und dem Polyzystischen Ovar Syndrom (PCOS), einem PCO mit zusätzlichen klinischen Befunden wie Anovulation und Hyperandrogenämie (3).

Die große phänotypische Variabilität und Heterogenität erschweren eine exakte Diagnosestellung und damit auch genaue Angaben zur Häufigkeit der Erkrankung.

Entsprechend der genannten Definition liegt die Prävalenz eines PCOS bei etwa 5 % (4). Die Angaben verschiedener Autoren schwanken zwischen 3 und 22 % in Abhängigkeit von den Diagnosekriterien (3). Somit gilt dieses Syndrom als die häufigste endokrinologische Erkrankung der geschlechtsreifen Frau.

### **1.2.2 Klinik**

Zu den Hauptkriterien für die Diagnose PCOS zählen Anovulation und Hyperandrogenämie sowie daraus resultierende klinische Symptome wie Sterilität und Zyklusunregelmäßigkeiten als Oligo- oder Amenorrhoe. Häufige dermatologische Befunde bei PCOS-Patientinnen sind Akne (die chronische Entzündung der Haar-Talgdrüsen-Einheit), Seborrhoe (vermehrte

Talgproduktion) und Hirsutismus (das Vorliegen eines maskulinen Behaarungsmusters bei Frauen). Ein großer Teil der PCOS-Patientinnen weist darüber hinaus metabolische Störungen wie Adipositas, Hyperinsulinämie oder Dyslipoproteinämie auf (5).

### 1.2.3 Morphologie

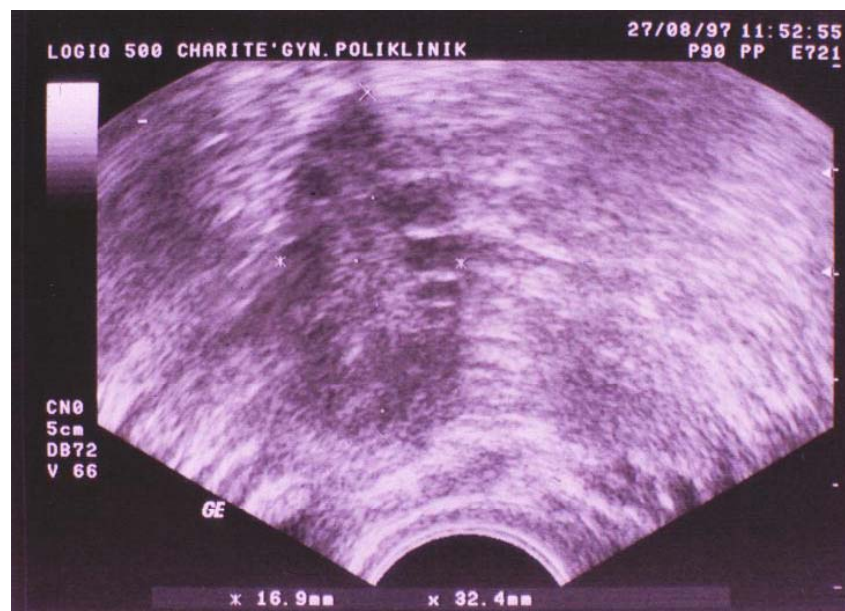
Zu den histomorphologischen Befunden bei polyzystischen Ovarien zählen eine verdickte Tunica albuginea, hyperplastische Theka- und Stromazellen und zahlreiche, subkapsulär gelegene Follikel (6).

Bei der vaginalsonographischen Untersuchung müssen für die Diagnose PCO folgende Kriterien erfüllt sein (7):

Ovaromegalie (maximaler Gesamtdurchmesser über 30 mm)

Vorliegen von zahlreichen (mindestens 10) kleinen (2-8 mm) subkapsulär gelegenen Follikeln  
zentrale Hyperfibrosis.

Die Abbildung 1.1 zeigt ein typisches vaginalsonografisches Bild eines polyzystischen Ovars.



**Abb. 1.1:** Transvaginale sonografische Darstellung des linken Ovars bei einer 32jährigen Patientin mit PCO. Typische Verdickung der Tunica albuginea, zahlreiche randständige Follikel (Quelle: Frauenklinik der Charité Campus Mitte).



#### 1.2.4 Biochemische Befunde

Im Zusammenhang mit einem PCOS findet sich typischerweise folgende Hormonkonstellation. Erhöhte Serumkonzentrationen des Luteinisierenden Hormons (LH) bei normalen Spiegeln an Follikel Stimulierendem Hormon (FSH) führen zu einer Verschiebung des LH/FSH-Quotienten zugunsten des LH. Die chronische Erhöhung des LH beruht auf einer Störung der pulsatilen LH-Freisetzung im Sinne einer erhöhten Amplitude und Frequenz der LH-Sekretion aus dem Hypophysenvorderlappen. Stark erhöhte Basalwerte und ein exzessiver LH-Anstieg im LHRH-Test sprechen für das Vorliegen eines PCOS (8).

Ein weiteres hormonelles Merkmal des PCOS ist die Erhöhung eines oder mehrerer Androgenparameter. Dazu zählen freies und Gesamttestosteron ebenso wie die überwiegend adrenal synthetisierten Steroide Dehydroepiandrosteron (DHEA) bzw. Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEAS). Gleichzeitig ist das Sexualhormon-bindende Globulin (SHBG), das Transportprotein für Testosteron im Serum, bei PCOS-Patientinnen stark vermindert. DHEA und besonders DHEAS als vorwiegend adrenale Androgene sind bei ca. 50% der Patientinnen mit PCOS gegenüber der gesunden Bevölkerung erhöht (9). Auch das überwiegend aus dem Ovar freigesetzte Androstendion ist bei etwa 25% der PCOS-Patientinnen erhöht (10). Diese differente Androgensekretion wird bei der Stimulation durch intravenöse ACTH-Applikation durch einen überschießenden Anstieg der genannten Androgene besonders deutlich (9).

Die Serumkonzentrationen für Estradiol liegen weitgehend im Normbereich, wobei anzumerken ist, dass der präovulatorische  $E_2$ -Anstieg ausbleibt (11).

Neben diesen endokrinologischen Störungen weist eine große Zahl von PCOS-Patientinnen Störungen im Bereich metabolischer Parameter auf. So sind die basalen und die durch den oralen Glukosetoleranztest (oGTT) stimulierten Insulinspiegel ebenso wie die IGF-1-Spiegel erhöht (12, 13). Im Zusammenhang mit einer oft bestehenden Adipositas findet man erhöhte Leptinspiegel und eine Dyslipoproteinämie (14). Dabei sind die Werte für Cholesterin, Triglyceride und LDL im Serum erhöht bei gleichzeitig niedrigen HDL-Spiegeln. Die LDL/HDL Ratio ist zugunsten des LDL verschoben (15).

### 1.2.5 Pathogenese des PCOS

Zur Ätiologie des Syndroms ist keine einheitliche Aussage möglich, vielmehr handelt es sich um einen multifaktoriellen Prozess, der zu einer heterogenen Ausprägung der Symptome führt.

Lange Zeit galt, dass eine Störung der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse die Ursache des PCOS ist. Intraovarielle morphologische und funktionelle Störungen, die zweifellos eine wichtige Rolle spielen, werden aber nicht nur durch das entgleiste Gonadotropinniveau beeinflusst, sondern auch durch metabolische und adrenale Faktoren.

Die Basis einer Störung der **ovariellen Androgensynthese** scheint in einer Dysregulation der Aktivität der 17 $\alpha$ -Hydroxylase und der 17, 20-Lyase zu liegen. Als Folge dessen sind vor allem Androstendion und 17 $\alpha$ -OHP erhöht. Das tonisch erhöhte LH wirkt stimulierend auf die Thekazellen und bewirkt eine verstärkte Bildung der C19-Steroide in diesem Zellkompartiment. Vermehrt anfallende thekale Steroide werden in den Granulosazellen nur in ungenügendem Maße zu C18-Steroiden umgebaut (16).

Das Vorliegen vieler kleiner antral gelegener Follikel, die für die typische Morphologie der polyzystischen Ovarien verantwortlich sind, beweist, dass die frühen Stadien der Follikelreifung nicht gestört sind. Die Auswahl eines dominanten Follikels bleibt jedoch aus (17).

Etwa 50 % der PCOS-Patientinnen zeigen als Ausdruck einer vermehrten **adrenalen Androgensynthese** erhöhte Spiegel von DHEA, DHEAS und Androstendion (9).

Enzymdefekte, die bei der adrenalen Herkunft der Hyperandrogenämie eine Rolle spielen, sind neben einer hyperaktiven 17 $\alpha$ -Hydroxylase (17 $\alpha$ -OHase) und 17, 20-Lyase, vor allem eine vermindert aktive 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) und 21-Hydroxylase (21-OHase) (18).

In den letzten Jahren gab es zahlreiche Hinweise darauf, dass dem oft beobachteten erhöhten **Insulinniveau** eine ursächliche Bedeutung in der Pathogenese des PCOS zukommt.

Die Erhöhung der Seruminsulinspiegel, meist infolge einer Insulinresistenz, geht mit einer Erhöhung der Androgenspiegel einher. Umgekehrt kommt es bei der Normalisierung der Insulinspiegel zu einem Absinken der Androgene (19). Insulin führt im in vitro-Experiment

zur Expression von LH-Rezeptoren, zur Hyperplasie der Stroma- und Thekazellen des Ovars und zur Induktion der  $17\alpha$ -Hydroxylase und  $3\beta$ -HSD (20, 21, 22).

Ein weiterer Einflussfaktor auf den erhöhten Androgengehalt im Serum ist die verminderte hepatische Synthese von SHBG, dem Transportprotein von Androgenen im Blut. Der Gehalt an freien, wirksamen Androgenen ist somit erhöht (23).

### **1.2.6 Folgeerkrankungen**

Als Ursache für die Häufung kardiovaskulärer und maligner Erkrankungen sowie Diabetes mellitus bei PCOS-Patientinnen wird ein Zusammenhang mit metabolischen und endokrinologischen Veränderungen angenommen.

#### **1.2.6.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen**

Einer prospektiven Bevölkerungsstudie zufolge litten in der Gruppe der unter 50-Jährigen 27,8% der PCOS-Frauen unter einer behandlungsbedürftigen Hypertonie im Vergleich zu 3,5% in der gleichaltrigen Kontrollgruppe. Bei den über 50-Jährigen waren es 53,3% im Vergleich zu 17,3%. Das berechnete Herzinfarktrisiko war für die PCOS-Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe um den Faktor 4,2 erhöht (24). Beim 24-h-Blutdruckmonitoring von Frauen mit PCOS und Kontrollpersonen wiesen die PCOS-Frauen erhöhte Werte für den systolischen Blutdruck und den mittleren arteriellen Druck auf (25). Nach einer retrospektiven Auswertung der Daten von Patientinnen, bei denen vor 20 Jahren ein PCO histopathologisch verifiziert worden war, litten 39% an behandlungsbedürftiger Hypertonie im Gegensatz zu 11% in der Vergleichsgruppe ohne PCO-Anamnese (26).

#### **1.2.6.2 Diabetes mellitus**

Das PCOS ist häufig assoziiert mit peripherer Insulinresistenz und Hyperinsulinämie. Einer Untersuchung an 254 PCOS-Patientinnen unterschiedlicher ethnischer Herkunft zufolge ist die Inzidenz für Glukosetoleranzstörungen und Manifestation eines Typ 2-Diabetes mellitus bei PCOS-Frauen unabhängig von Body Mass Index (BMI) und ethnischem Hintergrund

deutlich gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Dabei erkrankten PCOS-Frauen im jüngeren Alter (27). Eine Langzeit-Beobachtung ergab, dass 15% der Patientinnen, bei denen 20-30 Jahre zuvor ein PCOS klinisch und histopathologisch diagnostiziert worden war, im perimenopausalen Alter an einem manifesten Diabetes mellitus erkrankt waren. In der Vergleichsgruppe waren es nur 2,3% (26).

### 1.2.6.3 Malignome

**Endometriumkarzinom.** Infolge der bei PCOS bestehenden Hyperandrogenämie und der anovulatorischen Zyklen kommt es zur langzeitigen Stimulation des Endometriums durch Östrogene. Dies führt zur Proliferation des Endometriums, wobei die nach der Ovulation durch Progesteron induzierte Umwandlung in sekretorisches Endometrium und Hemmung der weiteren Proliferation ausbleibt. Somit steigt das Risiko für PCOS-Patientinnen, eine adenomatöse Hyperplasie oder ein Endometriumkarzinom zu entwickeln. Vor allem bei jungen Frauen (15 bis 25 Jahre) mit Endometriumkarzinom findet man sehr oft polyzystische Ovarien (27). Den Ergebnissen der Cancer and Steroid Hormon Study des Center of Disease Control zufolge haben Frauen mit PCOS ein 5-fach erhöhtes Risiko, in ihrem Leben an einem Endometriumkarzinom zu erkranken (28).

Weitere Daten aus der Cancer and Steroid Hormon Study weisen darauf hin, dass das Risiko für **Ovarialkarzinome** bei Frauen mit PCOS auf das 2,5fache erhöht ist (29).

Die gehäufte Koinzidenz der genannten Krankheitsbilder mit PCOS unterstreicht die Bedeutung des Syndroms für den langfristigen Gesundheitszustand der Patientinnen.

### 1.2.7 PCOS und Gravidität

Bei Eintritt einer Schwangerschaft sind unter den PCOS-Patientinnen einige Risiken stärker ausgeprägt als in der Normalbevölkerung.

So scheint es eine Assoziation zwischen polyzystischen Ovarien und sowohl Gestationsdiabetes als auch schwangerschaftsinduzierter Hypertonie zu geben.

In einer vergleichenden Untersuchung von graviden PCOS-Patientinnen und Kontrollpersonen zeigte sich eine signifikant erhöhte Inzidenz für pathologische Befunde im

oralen Glukosetoleranztest, manifesten Gestationsdiabetes und schwangerschaftsinduzierte Hypertonie in der PCOS-Gruppe. Die Body-Mass-Indices waren in beiden Gruppen vergleichbar, so dass Adipositas als alleinige Ursache für die erhöhte Inzidenz an pathologischen Befunden ausscheidet (30).

In einer retrospektiven Untersuchung von Frauen mit Gestationsdiabetes in einer vorausgegangenen Schwangerschaft zeigten in der nachfolgenden vaginalsonografischen Untersuchung 44% polyzystische Ovarien, in der Kontrollgruppe dagegen 7% (21).

### **1.3 Ovarielles Hyperstimulationssyndrom (OHSS)**

#### **1.3.1 Einführung**

Das ovarielle Hyperstimulationssyndrom (OHSS) ist ein komplexes Krankheitsbild, das in Folge der kontrollierten ovariellen Stimulation als Bestandteil der assistierten Reproduktion auftreten kann. Sein Auftreten ist gekoppelt an erhöhte Spiegel von LH bzw. Human Chorion Gonadotropin (HCG). Es ist fast ausschließlich iatrogen induziert und kann in Ausnahmefällen in eine intensivpflichtige Situation münden. Bisher wurde nur ein Fall des Auftretens eines OHSS im Zusammenhang mit einer spontan entstandenen Schwangerschaft bekannt (31).

Mit zunehmender Verbreitung der Techniken der assistierten Reproduktion nimmt auch die Inzidenz des OHSS zu. Seine Häufigkeit wird abhängig von der Ausprägung der Symptomatik mit 0,1 bis 1,8% (schwere Form) und 5,2 bis 5,8% (milde Form) aller stimulierten Zyklen angenommen (32).

#### **1.3.2 Klinik**

Leitsymptome des OHSS sind zystisch vergrößerte Ovarien sowie Ascites, was zu abdominellen Schmerzen und Spannungsgefühl führen kann. Bei sehr stark ausgeprägtem Ascites kann es zu einer massiven abdominellen Distension mit Darmmotilitätsstörungen und Erbrechen sowie zu einem Zwerchfellhochstand begleitet von Atembeschwerden kommen

(33). Eine mögliche Folge der extremen Größenzunahme der Ovarien ist die Stieldrehung der Adnexe mit dem Bild eines akuten Abdomens (34).

Ausgangspunkt der vitalen Komplikationen ist die gesteigerte Kapillarpermeabilität, die zu einer Transsudation proteinhaltiger Flüssigkeit und Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens und damit zu einer bedrohlichen Hämokonzentration führt. Infolge des erhöhten Hämatokrits (Hk) kann es zu venösen und arteriellen Thromboembolien und verminderter renaler Durchblutung mit Oligurie und Elektrolytentgleisungen kommen (35, 36).

Eine weitere Folge der gesteigerten Permeabilität kann das Auftreten von Pleura- oder seltener von Pericardergüssen sowie die Ausbildung eines intrahepatischen Ödems mit entsprechender Funktionsstörung sein (37, 38).

Die Beschwerden beginnen typischerweise am 5. bis 7. Tag nach Follikelpunktion und lassen häufig schon am 10. bis 11. Tag nach. Bei Eintreten einer Schwangerschaft kann es infolge der endogenen HCG-Produktion zu einer Zunahme der Beschwerden kommen (39). Typische biochemische Befunde sind erhöhte Werte für Estradiol (E2) und Progesteron sowie ein erhöhter Hämatokrit. Im Falle einer Beeinträchtigung der Nierenfunktion steigen die Werte für Harnstoff, Kreatinin und Serumelektrolyte, bei Leberbeteiligung findet man einen Anstieg von Glutamatoxalacetattransaminase (GOT), Glutamatpyruvattransaminase (GPT), Bilirubin, Alkalischer Phosphatase und Kreatininkinase (40).

### 1.3.3 Klassifikation

Der Schweregrad des ovariellen Überstimulationssyndroms wird nach einer Empfehlung der WHO wie in Tab.1.1. dargestellt eingestuft (41):

**Tab. 1.1: Klassifikation der Schweregrade des OHSS unter Einbeziehung der klinischen, sonografischen und laborchemischen Befunde.**

Grad	Labor	Sonographie	Klinik
<b>1</b> (leicht)	E2 > 3000 pg/ml	Ovarien bds. bis 5 cm	Abdominelles Spannungsgefühl
<b>2</b> (mittelgradig)	E2 > 5000 pg/ml Prog. > 30 pg/ml	Ovarien bds. bis 10 cm Ascites	zusätzl. Übelkeit, evtl. Diarrhoe
<b>3</b> (schwer)	zusätzl. Hk>50%	Ovarien über 10 cm	zusätzlich evtl. Pleuraergüsse

Abb. 1.2 zeigt das sonografische Bild der transvaginalen Untersuchung einer Patientin mit einem ovariellen Überstimulationssyndrom 2. Grades.



**Abb. 1.2: Transvaginalsonografische Abbildung des Situs einer 35jährigen Patientin mit einem ovariellen Überstimulationssyndrom 2.Grades. Ausgeprägter Ascites im Douglasschen Raum, kleiner anteflektierter Uterus, rechtes Ovar von 83 x 52 mm mit multiplen Follikeln (Quelle: Frauenklinik der Charité Campus Mitte)**

### **1.3.4 Pathogenese und Risikofaktoren**

Als Risikofaktoren für das Auftreten eines OHSS gelten ein hoher E2-Wert (42) sowie eine Vielzahl kleiner Follikel am Tag der HCG-Gabe (43). Lebensalter unter 35 Jahren, ein schlanker Habitus sowie das gleichzeitige Bestehen eines PCOS erhöhen das Risiko für ein OHSS (42, 43, 44).

Die Pathophysiologie der Mechanismen, die zur Entstehung eines OHSS führen, ist noch nicht vollständig aufgedeckt. Gesichert ist, dass die Grundvoraussetzung die exogene Applikation oder endogene Freisetzung von HCG bzw. LH ist (44). Die Ergebnisse der meisten klinischen und experimentellen Studien sprechen dafür, dass die Freisetzung vasoaktiver Substanzen durch das Ovar unter HCG-bzw. LH-Einfluss und damit die Zunahme der Kapillarpermeabilität der wesentliche Faktor bei der Entstehung eines OHSS ist (46, 47).

Es wird vermutet, dass verschiedene Faktoren, die eine gesteigerte Gefäßpermeabilität herbeiführen wie Prostaglandine, Histamin, Zytokine und das Renin-Angiotensin-System an der Entstehung beteiligt sind (48).

### **1.3.5 Koinzidenz von PCOS und OHSS**

Zahlreiche Studien belegen das gehäufte Vorkommen von OHSS bei PCOS-Patientinnen im Rahmen der ART. So wurden bei 63% einer Gruppe von Patientinnen mit schwerem OHSS im Ultraschall polyzystische Ovarien diagnostiziert (49). Umgekehrt entwickelten 10,5% einer Gruppe mit ultrasonografisch diagnostiziertem PCO ein OHSS während der kontrollierten ovariellen Hyperstimulation (50). Nach 1991 veröffentlichten Daten trat sogar in 46,7% der Stimulationszyklen bei PCOS-Patientinnen (die Diagnose eines PCOS erfolgte nach klinischen, ultrasonografischen und laborchemischen Kriterien) ein OHSS ersten (25%) bzw. zweiten Grades (21,7%) auf (44).

Das OHSS entwickelt sich auch bei PCOS-Patientinnen nahezu ausschließlich infolge der ovariellen Stimulation mit Gonadotropinen. Bei dem einzigen bisher bekannten Fall eines im Rahmen einer spontanen Schwangerschaft entstandenen OHSS handelt es sich um eine



19jährige 1-Gravida mit PCOS, die in der 10. SSW das Bild eines OHSS zweiten Grades bot (31).

Die pathophysiologischen Hintergründe der nachgewiesenen Assoziation zwischen PCOS und OHSS sind noch nahezu vollständig unklar. Diskutiert werden das Renin-Angiotensin-System, Interleukine, Tumornekrosefaktoren (TNF), vascular endothelial growth factor (VEGF).

## 1.4 21-Hydroxylase

### 1.4.1 Das Enzym 21-Hydroxylase

#### 1.4.1.1 Funktion der 21-Hydroxylase

Die 21-Hydroxylase ist eine Monooxygenase aus der Cytochrom P 450-Superfamilie (CYP). Sie spielt eine entscheidende Rolle in der Steroidhormonbiosynthese. Das Enzym katalysiert zum einen die Umwandlung von Progesteron in 11-Desoxycorticosteron (Vorstufe des Aldosterons) und zum anderen die Synthese von 11-Desoxycortisol (Vorläufer des Cortisols) aus 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17 $\alpha$ -OHP).

Bei gestörter Enzymfunktion kommt es zur Akkumulation der Steroidmetabolite vor dem 21-Hydroxylierungsschritt, d.h. von Progesteron und 17 $\alpha$ -OHP. Diese dienen dann als Substrat für die Androgenbiosynthese und es resultiert ein Überschuss an Androgenen. Der Mangel an Cortisol wiederum ruft über einen Feedback-Mechanismus eine gesteigerte Ausschüttung von ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen hervor, was seinerseits die Steroidhormonsynthese stimuliert, zu einer adrenalen Hyperplasie und zur weiteren Steigerung der Androgenproduktion führt (51).

#### 1.4.1.2 Klinik des 21-Hydroxylase-Mangels

Die Funktionsstörung der 21-Hydroxylase ist die häufigste Ursache für ein Adrenogenitales Syndrom (AGS) oder auch kongenitale adrenale Hyperplasie (CAH). Entsprechend der Schwere des Enzymdefektes und der daraus folgenden klinischen Symptome werden verschiedene Formen der kongenitalen adrenalen Hyperplasie unterschieden. Die schwere Form des 21-Hydroxylase-Mangels tritt mit einer Häufigkeit von 1: 5 000 bis 1: 10 000 auf, die mildere Form findet man innerhalb der kaukasischen Rasse bei 0,3% (52).

Die schwerste Form, das **Salzverlustsyndrom** (SW= salt wasting) geht mit Natrium- und Wasserverlust und Kaliumretention einher, was lebensbedrohliche Krisen der Neugeborenen zur Folge haben kann.

Bei der Form ohne Salzverlust, jedoch mit schwerer Funktionseinbuße der 21-Hydroxylase, bei der die Virilisierung infolge des extrem erhöhten Androgenniveaus im Vordergrund steht, spricht man von **einfacher virilisierender Form** (SV= simple virilising). Die betroffenen weiblichen Neugeborenen fallen durch ein maskulin erscheinendes äußeres Genitale bei eindeutig weiblichem chromosomalen Geschlecht auf (Pseudohermaphroditismus femininus).

Männliche Neugeborene zeigen einen unauffälligen Phänotyp. Sie werden jedoch infolge der pathologisch erhöhten Androgenspiegel eine Pseudopubertas praecox entwickeln, die von beschleunigter Knochenreifung, vorzeitigem Epiphysenschluss und daraus resultierender kleinwüchsiger Statur gekennzeichnet ist (53).

Die spätmanifeste **non classical** oder **late onset Form** des 21-Hydroxylase-Mangels wurde erstmalig von Gynäkologen beschrieben, die Frauen mit Hyperandrogenismus und Infertilität erfolgreich durch die Gabe von Glukocorticoiden behandelten.

Diese Form der Erkrankung wird nur bei weiblichen Patienten symptomatisch in Form von Menstruationsstörungen, Akne, Hirsutismus und Seborrhoe (54). Darüber hinaus zeigten bei einer Untersuchung von Patientinnen mit adrenogenitalem Syndrom ca. 80% der Patientinnen im vaginalen Ultraschall polyzystische Ovarien (55).

Es liegt demzufolge nahe, dass ein Zusammenhang zwischen einer Funktionsminderung der 21-Hydroxylase und dem klinischen Bild eines PCOS besteht. Dies veranlasste uns, das Enzym 21-Hydroxylase bei unseren PCOS-Patientinnen sowohl biochemisch als auch molekulargenetisch zu untersuchen, um eventuelle Zusammenhänge zwischen Allelen des Gens und klinischen und biochemischen Ausprägungen aufzudecken.

#### **1.4.1.3 Diagnostik des 21-Hydroxylase-Mangels**

Ein niedriger Spiegel an Cortisol im Serum bei gleichzeitig erhöhten Basalwerten für  $17\alpha$ -OHP in der frühen Follikelphase sowie ein erhöhtes 21-Desoxycortisol (21-DOF) geben Hinweise auf eine verminderte Aktivität der 21-Hydroxylase (56).

Durch einen ACTH-Test lassen sich diese Abweichungen des Hormonprofils von der Norm noch deutlicher nachweisen. Infolge der Stimulation durch ACTH kommt es zu einem starken Anstieg von  $17\alpha$ -OHP und 21-DOF, während Cortisol nur schwach ansteigt. Mittels

hormonanalytischer Methoden kann man so neben homozygoten auch etwa 50% der Fälle mit heterozygoten Defekten im Genort der 21-Hydroxylase, die mit einer Minderung der Funktion des Enzyms einhergehen, erkennen (56, 57).

Das Schema in Abb. 1.3 legt die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Komponenten der Steroidhormonbiosynthese dar.

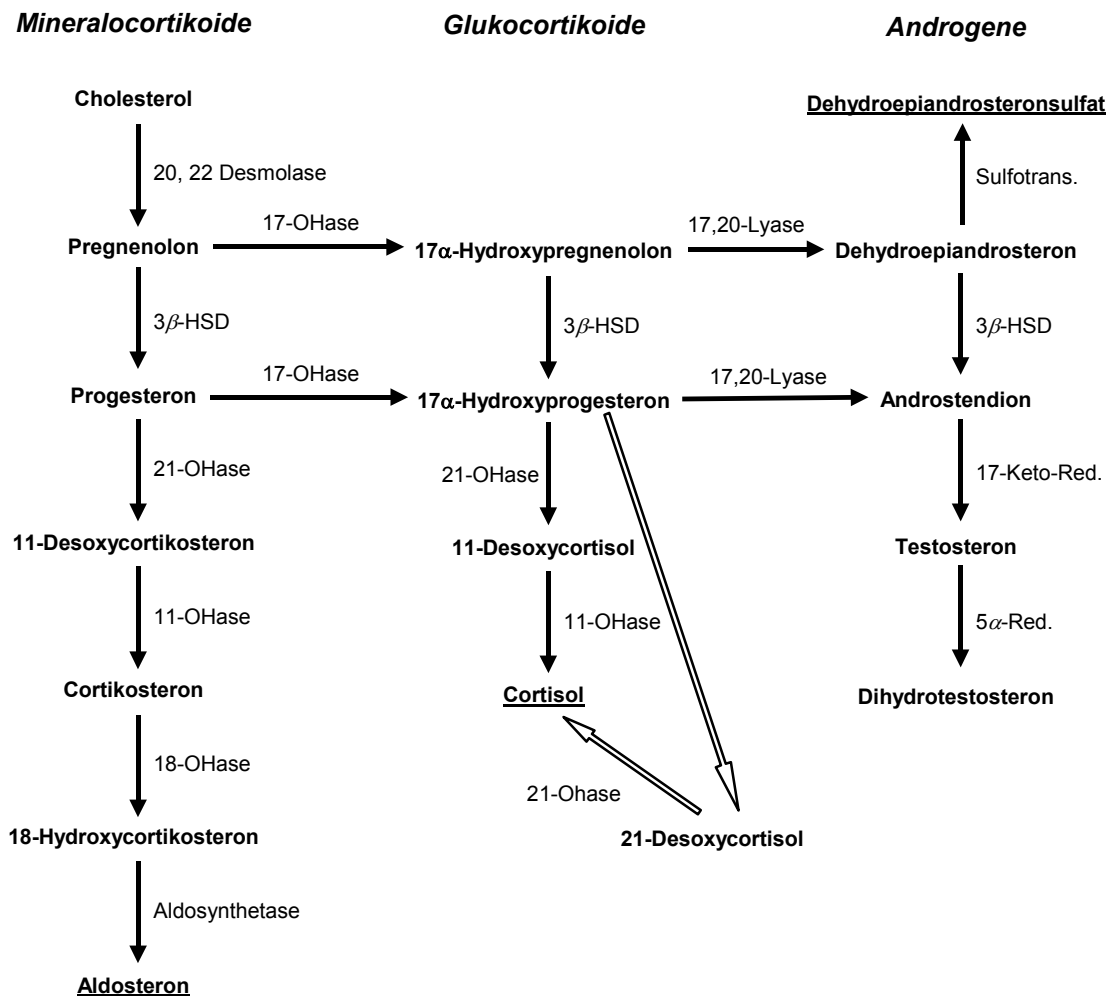


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der adrenalen Steroidhormonbiosynthese

#### 1.4.2 Das Gen *CYP 21*

Die c-DNA, die die Information für das Enzym 21-Hydroxylase enthält, umfasst ca. 2,0 kb. Das kodierte Protein enthält 494 Aminosäuren (58).

Das kodierende Gen heißt *CYP21*, ist 3,4 kb groß und besteht aus 10 Exon- und 9 Intronbereichen. Es existieren zwei fast identische Varianten dieses Gens, wovon das *CYP21A2*-Gen als das aktive Gen, das *CYP21A1*-Gen dagegen als Pseudogen bekannt ist. Beide liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 in der HLA-MHC-Klasse III Region

etwa 30 kb voneinander entfernt (59). Beide Gene sind jeweils in unmittelbarer Nachbarschaft der 3'-Enden der beiden Komplement C4 kodierenden Gene lokalisiert (60). Die Homologie der Nukleotidsequenzen zwischen beiden Genen beträgt 98% im Exonbereich und 96% im Intronbereich, sie differieren in nur 88 Basen (58). Typisch für das Pseudogen ist eine 8 Basenpaare umfassende Deletion in Exon 3, die zum Frame shift führt sowie eine T-Insertion in Exon 7 und eine C-T-Transition in Exon 8, woraus jeweils ein Stop-Codon resultiert (58, 59).

Patienten mit homologer Deletion des *A1-Gens* synthetisieren Cortisol in normalem Umfang, wohingegen Patienten mit homozygoter *A2-Gen*-Deletion die klinischen und laborchemischen Befunde eines 21-Hydroxylase-Mangels aufweisen. Daraus folgt, dass nur das *CYP21A2*-Gen für das Enzym 21-Hydroxylase kodiert. Das *CYP21A1*-Gen dagegen hat keine funktionelle Bedeutung (60).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Alle Probandinnen wurden aus dem Patientengut der Abteilung für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie der Charité-Frauenklinik rekrutiert.

Für alle Gruppen gemeinsam gilt, dass nur geschlechtsreife Frauen in die Studie eingeschlossen wurden. Eine weitere **Einschlussvoraussetzung** war das Vorliegen einer Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie. Als allgemeine **Ausschlusskriterien** galten schwerwiegende chronische Erkrankungen, die Einfluss auf die hormonelle Situation der Patientin haben könnten, hormonelle Substitutionstherapie oder eine bestehende Schwangerschaft. Die in die Studie eingeschlossenen Patientinnen wurden einer der drei folgenden Gruppen zugeordnet.

#### Kontrollgruppe (n= 23)

In diese Gruppe wurden Patientinnen eingegliedert, bei denen als Sterilitätsursache endokrinologische Ursachen weitgehend ausgeschlossen werden konnten, d.h. Patientinnen mit tubarer Sterilität oder andrologisch bedingter Kinderlosigkeit. Bei diesen Patientinnen durften im Ultraschall keine polyzystischen Ovarien darstellbar sein und es sollte höchstens eines der klinischen Merkmale Akne, Hirsutismus oder unregelmäßiger Zyklus bestehen.

#### Patientinnen mit PCOS (n= 22)

Einschlussvoraussetzung für diese Gruppe waren ultrasonografisch nachgewiesene polyzystisch veränderte Ovarien in Verbindung mit mindestens zwei der weiteren klinischen Merkmale Oligo- oder Amenorrhoe, Akne, Hirsutismus, primäre oder sekundäre Sterilität.

#### Patientinnen mit PCOS und OHSS (n= 17)

Voraussetzung für die Zuordnung zu dieser Gruppe waren ein nach den oben aufgeführten Kriterien diagnostiziertes PCOS zusammen mit mindestens einer Episode eines Ovariellen Überstimulationssyndroms (OHSS) in der Anamnese. Ein OHSS wurde diagnostiziert, wenn folgende Bedingungen erfüllt waren. Die Patientin litt unter abdominellem Spannungsgefühl und Unwohlsein, in der vaginalen Ultraschalluntersuchung waren beidseits zystisch vergrößerte Ovarien von mindestens 50 x 50 mm Größe und freie Flüssigkeit im Bauchraum

darstellbar. Zusätzlich waren Plasmaprogesteronspiegel von mindestens 20 pg/ ml und Estradiolspiegel von mindestens 3000 pg/ ml Voraussetzung für die Diagnose Ovarielles Überstimulationssyndrom.

## **2.2 Untersuchungsablauf**

Um die Vergleichbarkeit der erhobenen Befunde zu gewährleisten und den Einfluss der zyklischen Veränderung der Hormonspiegel auf unsere Untersuchungsergebnisse möglichst gering zu halten, entschieden wir uns, die Untersuchungen für alle Patientinnen zu standardisieren.

Die Ultraschalluntersuchung wurde im Rahmen der Zyklusdiagnostik am 21. Zyklustag durchgeführt. Sie ist Bestandteil der Routineuntersuchungen bei unseren Kinderwunschpatientinnen. Dabei erhoben wir auch die Befunde im Hinblick auf klinische Merkmale wie Akne und Hirsutismus.

Für die Erhebung der endokrinologischen Daten wurde jede Patientin für den dritten (ausnahmsweise auch den zweiten oder vierten) Tag ihres nächsten Zyklus einbestellt.

Die Patientin kam im nüchternen Zustand (letzte Nahrungsaufnahme am vorhergehenden Abend). Am Morgen des Testes durfte die Patientin nur ungesüßte Getränke zu sich nehmen.

Der Patientin wurden die Durchführung und die Bedeutung der Hormontests sowie die möglichen Risiken und Nebenwirkungen erläutert. Unter diesen ist vor allem die allergische Reaktion auf synthetisch hergestelltes LHRH oder ACTH zu nennen. Der Patientin wurden mögliche Symptome erläutert und sie wurde darauf hingewiesen, bei jeglicher Form von Unwohlsein das Pflegepersonal zu informieren. Abschließend wurde die Zustimmung der Patientin für die Durchführung der Hormontests und der genetischen Untersuchungen eingeholt.



Im Zusammenhang mit der Aufklärung über den Ablauf der endokrinologischen Untersuchungen führten wir ein längeres Gespräch mit der Patientin. Dabei wurde die Zyklusanamnese erhoben, der Blutdruck gemessen sowie Körpergröße und Körpergewicht der Patientin ermittelt.

Danach erfolgten im analytischen Grundprogramm der Medizinischen Poliklinik alle Blutentnahmen für endokrinologische und genetische Untersuchungen. Die Proben wurden an die entsprechenden Speziallaboratorien weitergeleitet.

Die erhobenen Befunde wurden beim nächsten Sprechstundentermin, den die Patientin in unserer Poliklinik hatte, besprochen.

## **2.3 Klinische Untersuchungen**

Die Vaginalsonografie wurde im Rahmen der Zyklusdiagnostik am 21. Zyklustag durchgeführt. Sie ist Bestandteil der Routineuntersuchungen bei unseren Kinderwunschpatientinnen.

Für die ultrasonografische Diagnose polyzystischer Ovarien galten die im folgenden beschriebenen Kriterien. Die Ovarien mussten einen maximalen Durchmesser von mindestens 30 mm (Ovaromegalie) in Kombination mit einer zentralen Hyperfibrose aufweisen. Ein weiteres wichtiges Kriterium war die Darstellbarkeit von zahlreichen (mindestens 10) kleinen subkapsulär gelegenen Follikeln.

Auch die Zyklusanamnese sowie die körperliche Untersuchung im Hinblick auf Akne, die chronische Entzündung der Haar-Talgdrüsen-Einheit, und Hirsutismus, die verstärkte Sexual-, Körper- und Gesichtsbehaarung vom männlichen Verteilungsmuster bei der Frau, wurden in Zusammenhang mit der Zyklusdiagnostik vorgenommen.

Des weiteren wurden Körpergewicht (in kg) und Körpergröße (in m) der Patientin ermittelt. Daraus wurde dann der Body Mass Index nach folgender Formel errechnet:

$$\text{BMI} = \text{Gewicht in kg} / (\text{Größe in m})^2$$

Der Blutdruck der Patientin wurde im Sitzen nach der Methode von Riva und Rocci (RR) gemessen. Diese Untersuchung erfolgte am dritten Zyklustag in Zusammenhang mit der Erhebung der hormonellen Befunde.

## **2.4 Endokrinologische Untersuchungen**

Die Ermittlung der Serumspiegel für Estradiol, Progesteron und Prolaktin wurden ebenso wie die Bestimmung des VEGF im hormonanalytischen Labor der Frauenklinik der Charité durchgeführt.

Zur Testung der Hypophysenvorderlappenfunktion unterzogen wir unsere Patientinnen einem LHRH-Test, zur Testung der Nebennierenrindenfunktion einem Corticotropinkurztest. Beide Tests wurden am 3. Zyklustag morgens zwischen 7.00 und 9.00 Uhr durchgeführt. Sie beinhalteten jeweils die basale (nicht stimulierte) Blutentnahme aus einer Armvene sowie die intravenöse Injektion von LHRH-Ferring bzw. von 0,25 mg synthetisch hergestelltem ACTH (Synacten der Firma Ciba Geigy). Anschließend erfolgten weitere Blutentnahmen 30 und 60 min (LHRH-Test) bzw. 60 min (ACTH-Test) nach Injektion des entsprechenden Medikamentes. Dabei wurden jeweils 20 ml Armvenenblut in heparinisierte Monovetten der Firma Sarstedt entnommen.

Die Bestimmung der Hormonwerte im Zusammenhang mit dem LHRH-Test bzw. ACTH-Test (LH, FSH, Cortisol, freies und Gesamttestosteron, SHBG, DHEA, DHEA-S, Androstendion, 17 $\alpha$ -OHP und 21-DOF) sowie der Parameter Insulin, IGF-1 und Leptin erfolgte in den Laboratorien des Institutes für Experimentelle Endokrinologie der Charité.

### **2.4.1 LHRH-Test**

Zur Ermittlung der Werte für **LH** und **FSH** wurde ein enzymimmunometrischer Assay der Firma Biochem Immunosystems GmbH (Freiburg) eingesetzt. Er beinhaltet zwei

monoklonale Antikörper, von denen einer mit Fluoreszein markiert und gegen die  $\alpha$ -Untereinheit des Glukoproteohormons gerichtet, der andere mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt und gegen die  $\beta$ -Untereinheit gerichtet ist. Die Konzentration wurde in mIU/ ml angegeben. Die Intraassayvarianz beträgt 4,8 bis 7,5% für LH und 5,2 bis 7,5% für FSH.

Die Interassayvarianz liegt für die LH-Werte zwischen 4,0 und 8,4%, für die FSH-Werte zwischen 5,3 und 6,4%.

#### 2.4.2 ACTH-Test

Die Bestimmung der Plasmawerte für **Cortisol** erfolgte mittels Radioimmunoassay (RIA) der Firma Immunotech Coulter Comp. (Marseille, France). Die Intraassayvarianz reicht von 3,1 bis 5,8%, die Interassayvarianz von 5,3 bis 9,2%.

Die Plasmawerte für **Testosteron** wurden mittels Enzymimmunoassay der Firma Biochem Immunosystems GmbH (Freiburg) erhoben (Intraassayvarianzkoeffizient 6,2-10,0%, Interassayvarianzkoeffizient 11,0-12,0%).

**Freies Testosteron** (a) ebenso wie **Androstendion** (b) wurden mittels Festphasen-RIA unter Verwendung von Kits der Firma Diagnostic Systems Laboratories GmbH (Sinsheim) ermittelt. Dabei beträgt die Intraassayvarianz zwischen 3,7 und 6,2% (a) bzw. 2,8 und 5,6% (b), die Interassayvarianz zwischen 7,3% und 9,7% (a) bzw. 6,0 und 9,8% (b).

Zur Bestimmung des **DHEA-S** wurde ein Enzymimmunoassay der Firma Biochem Immunosystems GmbH (Freiburg) verwendet (Intraassayvarianz 6,4-7,0%, Interassayvarianz 10,8-16,6%).

**DHEA** wurde mit einem Festphasen-Radioimmunoassay von Immuno Tech Coulter Comp. (Marseille, France) bestimmt (Intraassay-Varianzkoeffizient 6,9 bis 7,9%, Interassay-Varianzkoeffizient zwischen 10,5 und 11,9%).

Die Werte für **17 $\alpha$ -OHP** wurden mit Hilfe eines RIA der Firma ICN Biomedicals GmbH gemessen (Intraassayvarianz 7,8-12,3%, Interassayvarianz 9,8-12,9%).

Die Ermittlung der Werte für **21-Deoxycortisol** erfolgte nach der von Fiet et al. etablierten Methode (61). Dazu führten wir einen RIA unter Nutzung eines Tracers der Firma Amersham-Buchler GmbH, Braunschweig und eines Antikörpers gegen 21-DOF, der uns freundlicherweise von Dr. Paul Vecsei, Heidelberg, zur Verfügung gestellt wurde, durch. Der Koeffizient der Intraassayvarianz betrug dabei 12%, der Koeffizient der Interassayvarianz 16%.

### 2.4.3 Metabolische Parameter

Für die Bestimmung des Gesamt-Serum-**Leptins** nutzten wir den Human-Leptin-RIA der Firma mediagnost, Tübingen, (Intraassayvarianz unter 5%, Interassayvarianz 7,6%).

Die Serumwerte für sowohl **Insulin** als auch **IGF-1** wurden mittels der entsprechenden Radioimmunoassays der Firma Biochem Immunosystems, Freiburg ermittelt. Für den Insulin-RIA lag die Intraassayvariation zwischen 4,2 und 7,4%, die Interassayvariation zwischen 4,1 und 8,0 %. Die Intraassayvarianz für den IGF-1-RIA lag bei 2,9 bis 5,4 %, die Interassayvarianz bei 4,3 bis 7,1 %.

## 2.5 Genetische Untersuchungen

### 2.5.1 Präparation genomischer DNA

Die Präparation der genomischen DNA erfolgte aus etwa 10 ml gefrorenem EDTA-Blut nach der von Miller et al. publizierten Vorschrift (62). Dazu wurde das Blut bei 37° Celsius aufgetaut, mit dem vierfachen Volumen an KCl versetzt und vorsichtig gemischt. Zur Sedimentation der Zellen wurde das Gemisch 10 min lang bei 4° C und 5000 rpm zentrifugiert, danach wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet homogenisiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Sedimentationsschritt wurde das Zellpellet in 3 ml Lysepuffer, 200 µl 10%igem SDS und 50 µl Proteinase K resuspendiert und für 2 h bei 55° C oder über Nacht bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte die Extraktion mit Phenol, Phenol-Chloroform bzw. Chloroform jeweils durch Abheben der Oberphase nach 10 minütiger Zentrifugation bei 5000 rpm. Dann wurde die DNA mit dem zweifachen

Volumen an absolutem Alkohol gefällt, auf einen vorher sterilisierten Glasstab gewickelt und mit 70%igem Alkohol nachgewaschen. Die DNA wurde für ca. 10 min luftgetrocknet und danach in 500 bis 1000 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentration und Reinheit der DNA bestimmten wir durch Ermittlung der Absorptionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 269 bzw. 280 nm. War der Quotient aus beiden Koeffizienten größer als 1,8, so musste die Chloroformextraktion wiederholt werden, weil der Eiweißgehalt der entsprechenden Proben zu hoch war.

### **2.5.2 Untersuchung der DNA**

Zur effektiven Darstellung großer Deletionen oder Genkonversionen im *CYP21*-Gen sowie durch „anequal crossing over“ entstandener 30 kb großer Deletionen bzw. Duplikationen untersuchten wir die genomische DNA unserer Patientinnen zuerst mit der Southern-Blot-Analyse. Zum Nachweis von Punktmutationen nutzten wir die PCR zur spezifischen Amplifikation des *CYP21A2*-Gens und die Methoden der manuellen bzw. der automatischen Sequenzierung zur Darstellung der exakten Basenfolge des gesamten Gens.

#### **2.5.2.1 Southern-Blot-Analyse**

Zur getrennten Darstellung beider Genbereiche (*A1*- und *A2*-Gen) wurde die genomische DNA der Patientinnen mittels zweier spezieller Restriktionsenzyme gespalten und anschließend mittels Elektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran überführt. Bei den eingesetzten Enzymen handelt es sich um die beiden Restriktionsendonukleasen Taq I und Bgl II. Wir erhielten auf diese Weise 3,2 kb bzw. 12 kb große Fragmente für das *CYP21A1*-Gen und 3,7 bzw. 10 kb große Fragmente für das *CYP21A2*-Gen, die durch die Hybridisierung mit der Plasmidsonde p21c/3c sichtbar gemacht werden konnten (63).

## Restriktionsspaltung

Für die Taq I -Spaltung wurden jeweils 6 µg DNA zusammen mit 5 µl eines Taq-spezifischen Puffers (10fach Buffer E der Firma Promega) und 30 U Enzym (Taq I der Firma Promega) in einem 50 µl-Ansatz gemischt und für 3 h bei 65°C inkubiert.

Für die Bgl II-Spaltung wurde ein Ansatz von 6 µg DNA, 5 µl Puffer (10fach Buffer D der Firma Promega) und 30 U Enzym (Bgl II der Firma Promega) für 4 h bei 37° C inkubiert.

Um die vollständige Spaltung aller eingesetzten DNA-Proben sicherzustellen, versetzten wir eine 5 µl-Probe der Restriktionsfragmente mit 5 µl eines 0,01 %igen Bromphenolblau-Probenpuffers und ließen sie für ca. 45 min bei einer Spannung von 60 V in einem 0,8%igen Agarose-Kontrollgel laufen. Wenn unter UV-Exposition keine umfassende Auftrennung nachgewiesen werden konnte, wurden die betroffenen Proben für eine weitere Stunde zusätzlich mit 10 U des Enzyms gespalten.

## Elektrophorese

Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden nun durch Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt. Dazu versetzten wir die gesamte Probe mit 5 µl eines 0,06 %igen Bromphenolblau-Probenpuffers und brachten sie auf ein 0,8 %iges Agarosegel auf, in dem Ethidiumbromid (EtBr) in einer Konzentration von 0,05 ng/ ml enthalten war. Das Agarosegel befand sich in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Kammer. Bei einer Spannung von 65 V ließen wir die mit Taq I gespalteten Proben ca. 24 h, die mit Bgl II gespalteten Proben ca. 30 h im Gel laufen. Als Längenstandard führten wir 1 µg des Markers λ HIND III mit, der uns über den Grad der Auftrennung Auskunft gab.

Anschließend wurden die aufgetrennten Restriktionsfragmente mit Hilfe des im DNA-Doppelstrang interkalierenden und unter UV-Strahlung fluoreszierenden EtBr auf einem Transluminator der Firma Stratagene bei einer Wellenlänge von 320 nm sichtbar gemacht und durch ein Photo dokumentiert.

### Transfer und Fixierung der DNA-Moleküle auf der Membran

Um die Transfereffizienz dieser großen DNA-Spaltprodukte zu erhöhen, wurden diese durch eine Behandlung mit 0,25 M HCl und alkalischer Denaturierungslösung in situ fragmentiert. Die Einwirkung der HCl bewirkt dabei eine partielle Depurinisierung der DNA-Fragmente. Durch die anschließende Alkali-Behandlung kommt es zu einer Fragmentierung der DNA an den Stellen, an denen vorher die Purinbasen herausgelöst worden sind. Die zusätzliche Spaltung von Wasserstoffbrückenbindungen führt zur Umwandlung der dsDNA in ssDNA, die eine Voraussetzung für die Bindung an die Membran ist. Es folgte ein letzter Waschgang in einer Neutralisierungslösung. Zwischen den Waschschritten wurde das Gel in Aqua bidest. gespült.

Anschließend übertrugen wir die denaturierten DNA-Fragmente auf eine 0,2 µm dicke Nylonmembran (Biodyne A Transfer Membrane der Firma Pall Europe Limited). Dazu brachten wir die zugeschnittene Nylonmembran direkt auf das Agarosegel, überschichteten sie mit mehreren Lagen saugfähigen Filterpapiers und beschwerten sie mit Gewichten. Durch Kapillarkräfte wurde die DNA im Laufe mehrerer Stunden auf die Membran transferiert und anschließend durch eine zweiminütige UV-Exposition fixiert. Die einzelnen DNA-Fragmente spiegeln bei ihrer Fixierung auf der Membran die Größenverhältnisse nach der Gelelektrophorese exakt wider.

### Hybridisierung der Membran mit der Sonde

Im folgenden Arbeitsschritt hybridisierten wir die auf der Membran fixierte DNA mit der radioaktiv markierten Plasmidsonde p21c/3c.

Prähybridisierung und Hybridisierung wurden in speziellen Hybridisierflaschen durchgeführt. Zuerst wurden die Filter mit der DNA-Seite nach innen in die Flaschen eingebracht und mit 10 ml einer Vorhybridisierungslösung für mindestens 3h bei 65°C inkubiert. Die in der Vorhybridisierungslösung enthaltene DNA aus Heringssperma verhindert später eine unspezifische Bindung der radioaktiv markierten DNA-Sonde durch Blockade der entsprechenden Bindungsstellen.

Während der Inkubation führten wir die radioaktive Markierung der Plasmidsonde p21/3c durch. Dafür wurde die Sonden-DNA 5 min bei 100° C denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt und danach für 20 min mit dem radioaktiven  $\alpha\text{P}^{32}$ -dCTP markiert. Dazu verwendeten wir den High Prime DNA Labeling Kit der Firma Boehringer Mannheim.

Die Hybridisierung der Filter erfolgte über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen unter ständiger Rotation der Flaschen. Am nächsten Morgen wurden die Filter mit 2x bzw. 1x SSC-Lösung gewaschen, bevor sie luftblasenfrei in Plastikfolie verpackt wurden.

### Darstellung der Hybrid-Moleküle

Zur sichtbaren Darstellung der radioaktiv markierten Hybrid-Moleküle exponierten wir einen Röntgenfilm (Kodak XAR 5) zusammen mit einer Verstärkerfolie gegen den so behandelten Filter und lagerten ihn bei -70°C. Die Expositionszeit variierte je nach Signalstärke zwischen 1 und 14 Tagen. Die Entwicklung der belichteten Filme wurde in einer automatischen Entwicklermaschine (Sakura Film, Japan) durchgeführt. Parallel dazu wurden die Daten mit einem Phospho-Imager-System der Firma Fuji ausgewertet.

#### **2.5.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Nach dem Ausschluss großer Veränderungen innerhalb der *CYP21* gingen wir dazu über, das Gen auf Punktmutationen zu untersuchen. Dazu war zuerst die exponentielle Vervielfältigung des von uns untersuchten Genabschnittes nötig. Wir setzten dafür die Polymerase-Kettenreaktion ein.

Das Gen wurde in drei verschiedene Fragmente von jeweils 1000, 1100 bzw. 2100 Basenpaaren gegliedert und mittels drei verschiedener PCR-Varianten amplifiziert.

Für die PCR wurden jeweils 100 bis 500 ng genomischer DNA in einem Ansatz von 50 µl zusammen mit einer Pufferlösung, einer  $\text{MgCl}_2$ -Lösung, dNTP's, den entsprechenden Primern sowie der jeweils geeigneten Polymerase eingesetzt. Dieser Ansatz wurde gemischt und zentrifugiert, mit ca. 30 µl Mineralöl überschichtet und anschließend in einem Thermocycler der Firma Perkin-Elmer amplifiziert.



Für jedes der Amplifikate erfolgte die Auswahl spezifischer Primer sowie eine Optimierung der PCR-Bedingungen, wie im folgenden erläutert wird.

### PCR-Bedingungen

Bei dem Reaktionsansatz zur Amplifikation von Fragment 1 stammten der Reaktionspuffer mit  $\text{MgCl}_2$ , die dNTP's, Q-Solution sowie die Polymerase aus dem Taq PCR Core Kit der Firma Qiagen. Beim Reaktionsansatz für Fragment 2 und 3 setzten wir Reaktionspuffer,  $\text{MgCl}_2$ -Lösung sowie die Polymerase aus dem Expand High Fidelity Kit der Firma Boehringer Mannheim, die dNTP's der Firma Promega und Perfect Match der Firma Stratagene ein.

### Primerliste

Die Auswahl der Primerpaare erfolgte mit Hilfe des Programms "Oligo" (Version 4.0, MedProbe A.S.)

Dabei wurden die Primerpaare so gewählt, dass jeweils mindestens einer der Primer spezifisch für das *A2*-Gen ist. Das heißt mindestens einer der PCR-Primer enthielt eine Sequenz des *A2*-Gens, die sich an dieser Stelle von der des Pseudogens unterscheidet.

Des weiteren achteten wir darauf, dass die Schmelzpunkte beider Primer sich nicht wesentlich unterschieden und die interne Stabilität ausreichend war. Wir versuchten, Dimerbildung zwischen beiden Primern v.a. am 3'-Terminus sowie Haarnadelbildung innerhalb der Primer auszuschließen. In Tabelle 2.1 bis 2.3 sind die Sequenzen der PCR-Primer-Paare, die Thermoprofile der Cyclerprogramme und die Zusammensetzung der Ansätze zur Amplifikation der drei PCR-Produkte aufgezeigt.

**Tab. 2.1:** Sequenzen der PCR-Primerpaare zur Amplifikation von Fragment 1-3; r= reverse primer. Jeweils ein Primer enthält eine für das *CYP21A2*-Gen spezifische Sequenz.

Fragment	Primernamen	Sequenz (5'-3')
1 (1396-2373)	5'1	GGA CAC TAT TGC CTG CAG A
	110r	AGT AGT CTC CCA AGG ACA
2 (1997-3052)	71	GTG GTG CTG AAC TCC AA
	237r	GCA TCT CCA CGA TGT GA
3 (2394-4477)	110m	CCT GTC CTT GGG AGA CTA CT
	4564r	TCT CGC ACC CCA GTA TGA CT

**Tab. 2.2: Thermopprofile der Cyclerprogramme**

Fragment		1	2	3
Vordenaturierung	Temp	95° C	95° C	95° C
	Zeit	8 min	8 min	8 min
Denaturierung	Temp	94° C	94° C	94° C
	Zeit	1 min	1 min	1 min
Annealing	Temp	58° C	60° C	64° C
	Zeit	1 min	2 min	2 min
Elongation	Temp	72° C	72° C	72° C
	Zeit	2 min	2 min plus 20 sek je Zyklus	2 min plus 20 sek je Zyklus
Zyklenanzahl		40	30	35
Endelongation	Temp	72° C	72° C	72° C
	Zeit	10 min	10 min	10 min

**Tab. 2.3: Zusammensetzung der PCR-Ansätze**

Fragment	1	2	3
Ansatz	50 µl	50 µl	100 µl
DNA	500 ng	500 ng	500 ng
D NTP's	1,0 µl (10mM)	0,5 µl (20 mM)	1,0 µl (20 mM)
Puffer	5,0 µl (10x mit MgCl <sub>2</sub> )	5,0 µl (10x mit MgCl <sub>2</sub> )	10,0 µl (10x mit MgCl <sub>2</sub> )
Primer	0,3 µl 5'1 (100 mM)	0,5 µl 71 (50 mM)	2 µl 110m (120 mM)
	0,3 µl 110r (100 mM)	1,1 µl 237r (130 mM)	2 µl 4564 r (120 mM)
Enzym	0,25 µl Taq DNA Polym. (5,0 U/ µl)	0,35 µl Expand High Fid. (3,5 U/ µl)	1,0 µl Expand High Fid. (3,5 U/ µl)
Zusätze	5,0 µl Q-Solution	0,6 µl Perfect Match	

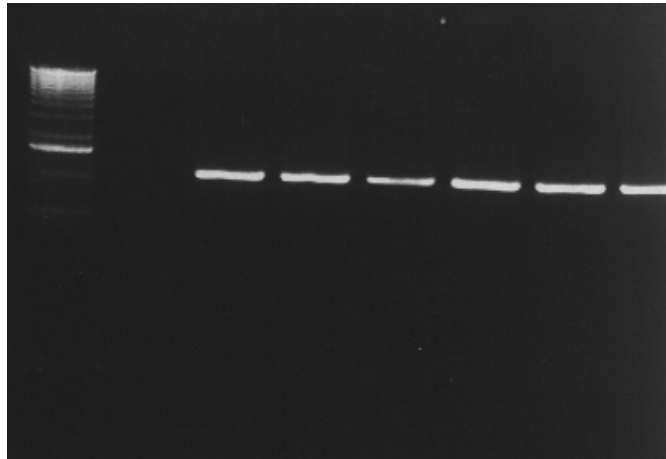
Um mögliche Verunreinigungen zu erkennen, wurde in jedem PCR-Ansatz eine Negativkontrolle mitgeführt, d.h. eine Wasserprobe, die keine DNA enthielt.

### Kontrolle der PCR-Produkte

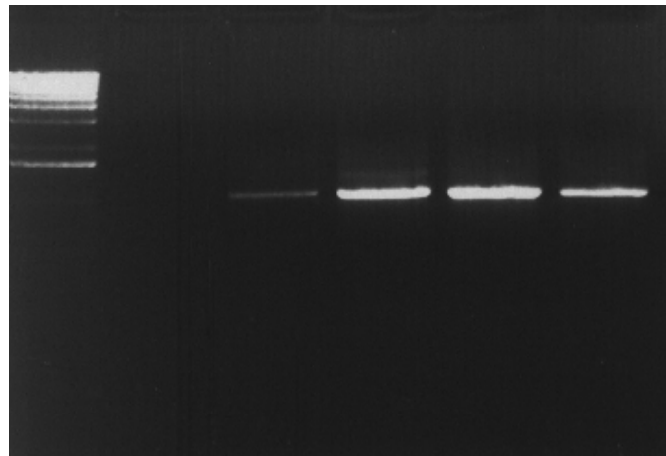
Die Kontrolle der amplifizierten Fragmente erfolgte je nach Amplifikatgröße auf einem 0,8% bzw. 2,4%igem Agarosegel, in dem Ethidiumbromid (EtBr) in einer Konzentration von 0,05 µg/ ml enthalten war. Dazu wurden jeweils 5 µl einer Probe mit 5 µl 0,01%igem Bromphenolblau-Probenpuffer versetzt und anschließend auf das Agarosegel aufgetragen, das sich in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer befand. Zusätzlich zu den Proben wurde immer auch 5 µl eines DNA-Längenstandards auf das Gel gegeben. Bei einer Spannung von 70 V ließen wir die Proben solange im Gel laufen, bis der Längenstandard genügend weit aufgetrennt war, damit ihm die Größe der Fragmente zugeordnet werden konnte.

Schließlich wurden die Amplifikate mit Hilfe des im Gel enthaltenen fluoreszierenden Farbstoffes EtBr auf einem Transluminator der Firma Stratagene bei einer Wellenlänge von 320 nm sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

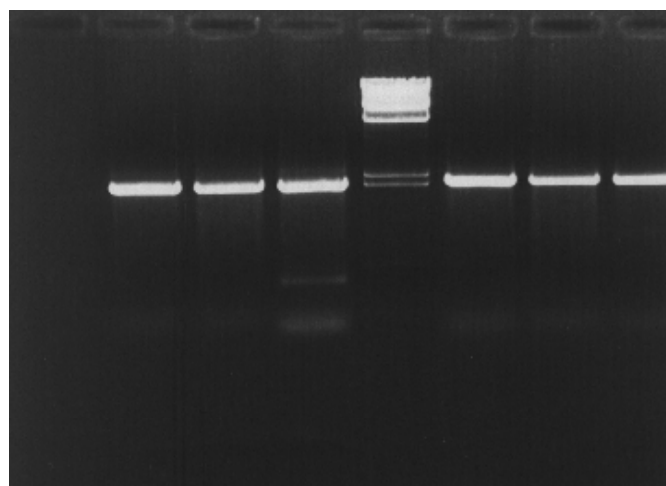
In den Abb. 2.1 bis 2.3 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte 1 bis 3 zu sehen.



**Abb. 2.1:** Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkt 1 (ca. 1000 bp) und Längenstandard.



**Abb. 2.2:** Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkt 2 (ca. 1000 bp) und Längenstandard.



**Abb. 2.3:** Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkt 3 (ca. 2000 bp) und Längenstandard.

### 2.5.2.3 Sequenzierung

Um Aufschluss über die genaue Aminosäuresequenz des gesamten Gens bei unseren Patientinnen zu gewinnen, wurden die Proben nach der enzymatischen Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert. Das wurde zum Teil manuell in unserem Labor und zum Teil automatisch im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik (MPI) durchgeführt.

#### Manuelle Sequenzierung

In unserem Labor wurde die manuelle Sequenzierung mit dem T7 Sequenase v 2.0 Kit von Amersham Life Science (Product number US70170) durchgeführt, die Fragmente mit dem Isotop  $\alpha\text{P}^{33}$ -dATP radioaktiv markiert und auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

**Vorbehandlung:** Zur Reinigung der amplifizierten DNA wurden jeweils 7  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt mit 1  $\mu\text{l}$  (10 U) Exonuklease und 1  $\mu\text{l}$  (2 U) Alkalischer Phosphatase versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die nachfolgende 15 minütige Inkubation bei 80° C diente der Inaktivierung der Enzyme.

**Annealing:** Den gereinigten Proben wurden 5-10 pmol des jeweiligen Sequenzierprimers zugefügt, bevor die Denaturierung bei 100°C für 2 bis 3 Minuten erfolgte. Zur Anlagerung der Primer wurde die Probe sofort für mindestens 5 min auf Eis gekühlt.

**Markierungsreaktion:** Zu der auf Eis gelagerten Probe fügten wir 2  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer, 1  $\mu\text{l}$  DTT, 2  $\mu\text{l}$  Labeling Mix in einer Verdünnung von 1:5, 2  $\mu\text{l}$  Sequenase (3,25 U) und 0,5  $\mu\text{l}$   $^{33}\text{P}\alpha$ -dATP hinzu. Wir mischten und zentrifugierten den Ansatz, inkubierten ihn 5 min bei Raumtemperatur und versetzten ihn anschließend mit 1  $\mu\text{l}$  Manganlösung.

**Kettenabbruchreaktion:** Bei der Polymerisationsreaktion dienen sowohl 2'-Desoxy-Nukleotide als auch 2'-3'-Dideoxy-Nukleotide, das heißt Nukleotide, die nicht nur an der 2'-Position sondern auch an der 3'-Position der Ribose desoxygeniert sind, als Substrat für die DNA-Polymerase. Diese können an ihrem 5'-Phosphatrest in eine wachsende DNA-Kette

eingebaut werden, führen aber zum Kettenabbruch, weil ihnen die 3'-OH-Gruppe als Bindeglied zum Phosphat des nächsten Nukleotids fehlt.

Dementsprechend wurden für die Sequenzierung einer Probe vier verschiedene Reaktionen mit jeweils einem anderen ddNTP durchgeführt. Für jede Probe wurden vier Eppendorfgläser mit jeweils 2,5 µl des entsprechenden Terminationsmixes bereitgestellt. Zu jedem dieser vier Ansätze gaben wir 3,5 µl der radioaktiv markierten Probe in gleichen Zeitabständen. Nach einer Inkubationszeit von 7 min bei 37°C wurde durch Zugabe von 4 µl Stop-Lösung ein Abbruch der Reaktion herbeigeführt.

Im Reaktionsgemisch eines Nukleotids entstehen auf diese Weise radioaktiv markierte DNA-Abschnitte unterschiedlicher Länge, deren Synthese stets beim Einbau des jeweiligen ddNTP abgebrochen wurde. Mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese der in den vier Reaktionen entstandenen DNA-Ketten kann man nach Autoradiographie über die unterschiedliche Kettenlänge die relative Position der Nukleotide zueinander und damit ihre Sequenz bestimmen.

**Sequenzierung:** Für die elektrophoretische Auftrennung der entstandenen Fragmente wurde 6%iges Polyacrylamidgel mit 800 µl 10% APS und 20 µl TE-MED versetzt und anschließend zwischen zwei vorbehandelte Glasplatten gegossen, die durch 0,35 mm dicke Spacer und einen Haifischkamm voneinander getrennt waren. Die Vorbehandlung der Platten beinhaltete eine gründliche Reinigung mit Spülmittel, Aqua bidestillata und Ethanol. Eine der beiden Platten wurde zusätzlich mit Haftsilan (Merck) benetzt. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer (Gibco BRL) eingespannt und bei 70 W und maximal 3000 V auf ca. 54°C vorgeheizt. Als Puffer diente eine 1x TBE-Pufferlösung. Dann wurden jeweils 2,5 µl der Nukleotidgemische nach 5-minütiger Denaturierung bei 95 °C in die nebeneinander liegenden Taschen in der Reihenfolge ACGT aufgetragen. Der Elektrophoreselauf fand bei ca. 70 W statt. Anhand des in der Stop-Lösung enthaltenen Farbstoffes konnte man abschätzen, wie weit die Proben im Gel gelaufen waren.

Nach ausreichender Auftrennung trennten wir die Platten voneinander, fixierten das Gel auf einem Filterpapier und trockneten es bei 75°C für 1h. Dann wurde der das Gel enthaltende Filter zusammen mit einem Film in einer Röntgenkassette gelegt. Nach mindestens 12-stündiger Exposition wurde der Film mit Hilfe der automatischen Entwicklermaschine Sakura-Film Japan entwickelt, und die Sequenz des Gens konnte direkt abgelesen werden.

### Automatische Sequenzierung

Unser Ziel war es, nicht nur bestimmte bereits bekannte Mutationen im *CYP21*-Gen bei unseren Patientinnen aufzudecken, sondern die gesamte Nukleotidsequenz des Gens im Hinblick auf Veränderungen und Polymorphismen zu untersuchen. Es wurden 13 verschiedene Sequenzierprimer eingesetzt, davon waren 7 Vorwärtsprimer und 6 Rückwärtsprimer. Diese Untersuchungen wurden am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik mit dem automatischen Kapillarsequenziergerät ABI Prism 3700 DNA Analyzer durchgeführt.

Im Gegensatz zur konventionellen Markierung mit radioaktiven Isotopen wird bei der automatischen Sequenzierung die DNA durch das Einbringen von Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dabei können gleichzeitig verschiedene Farbstoffe angeregt und detektiert werden, was bedeutet, dass in der Sequenzierung für jede Base eine eigene Farbe verwendet werden kann. Das Einbringen der Farbstoffe in die DNA erfolgt dabei nach der Sanger-Methode unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Für die Markierungsreaktion wurde der ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems eingesetzt.

Nach der Markierung folgt die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Elektrophoresesystem mit Polymer-gefüllten Glaskapillaren. Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe passieren die Fragmente dabei einen bestimmten Bereich, in dem ein Laserstrahl fokussiert ist. Das von den Farbstoffen emittierte Licht wird dann über Spiegelsysteme zur Detektionseinheit zurückgestrahlt und dabei in seine Spektralfarben zerlegt. Die Detektion der Spektralfarben erfolgt mit Hilfe des hochauflösenden Pixelfeldes einer CCD-Kamera. Die entsprechend ermittelten Farbimpulse werden dann aufgezeichnet und der jeweils stärkste Impuls an einer bestimmten Position in der Sequenz gibt Auskunft über die an dieser Stelle gelesene Base.

Zur Auswertung der auf diese Weise ermittelten Sequenzen nutzten wir ein speziell dafür erstelltes Unix-Programm.



## Sequenzierprimer

In Tabelle 2.4 sind die Basensequenzen der eingesetzten Sequenzierprimer aufgelistet.

**Tab. 2.4:** Sequenzen der eingesetzten Sequenzierprimer, r= reverse primer

Fragment	Primer-Nr.	Primer-Name	Sequenz (5'-3')
1	1	CYP21A2 1458	TCC TTG CTT CTT GAT GGG TGA T
1	X	CYP21A2 1845	GGC CCA TCT ACA GGC TCC AC
2	2	CYP21A2 2168	TCC TCC CAC CTC AGC CTC AA
3	3	CYP21A2 2665	CCT GCA GCA TCA TCT GTT ACC
3	4	CYP21A2 3149	ATT GCT ATG AGG CGG GTT CTT T
3	5	CYP21A2 3396	CAC TGA GAC CAC AGC AAA CAC
3	6	CYP21A2 4005	CAC ATG AGT TCT GGC CTG GTA
1	7	CYP21A2 2167r	TGA GGC TGA GGT GGG AGG AT
2	8	CYP21A2 2672r	GAA GGT GAG GTA ACA GAT GAT G
2	9	CYP21A2 2997r	ACC TGG ATT GGG GAA GAA CTG
3	10	CYP21A2 3402r	GAG AGG GTG TTT GCT GTG GTC
3	11	CYP21A2 3900r	TGA TGA AGG GGG CTG GAG TTA
3	12	CYP21A2 4415r	GGG AGC AAT AAA GGA GAA ACT G

## 2.6 Statistische Auswertung

Die bei der klinischen und endokrinologischen Untersuchung erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 7.5 ausgewertet. Dabei untersuchten wir zunächst die interessanten Daten auf Normalverteilung innerhalb der zu vergleichenden Gruppen. Je nach Verteilung der Daten verwendeten wir den Kruskal-Wallis-Test für Rangreihenvergleiche bei nicht normal verteilten Stichproben oder den T-Test für Mittelwertvergleiche bei normal verteilten Werten, um Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen. Zusammenhänge zwischen ordinalskalierten Variablen wurden mit Hilfe von Kontingenztafeln untersucht.

Zur Darstellung der Zusammenhänge zwischen metrischen Variablen wurden bei Normalverteilung der Korrelationskoeffizient nach Pearson, bei nicht normal verteilten Werten der Korrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der klinischen und biochemischen Untersuchungen

#### 3.1.1 Statistische Grundlagen

Nach Erhebung der Messergebnisse prüften wir die Daten zunächst auf Normalverteilung. Dazu nutzten wir die Möglichkeit der grafischen Darstellung der Datenverteilung in Form eines Histogramms sowie die zusätzliche objektive Überprüfung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test. Es zeigte sich, dass die erhobenen Daten nicht der Normalverteilung entsprachen. Deshalb wandten wir zur Darstellung der Ergebnisse den Vergleich der Medianwerte bzw. den H-Test nach Kruskal und Wallis sowie die Berechnung der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman als Tests für nicht normal verteilte Stichproben an.

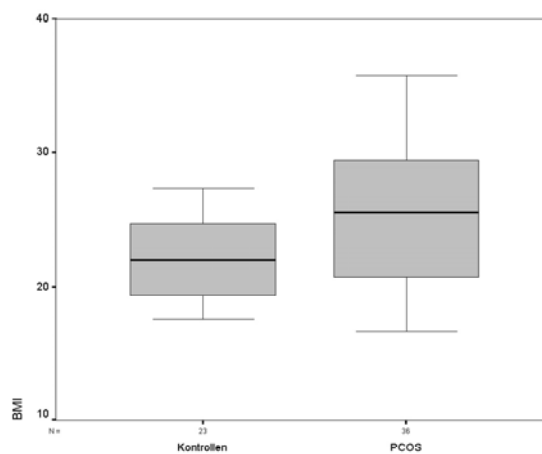
Es wurden jeweils die Kontrollpatientinnen mit der Gruppe aller PCOS-Patientinnen bzw. die PCOS-Patientinnen mit und ohne anamnestisches Überstimulationssyndrom miteinander verglichen.

#### 3.1.2 Klinische Befunde

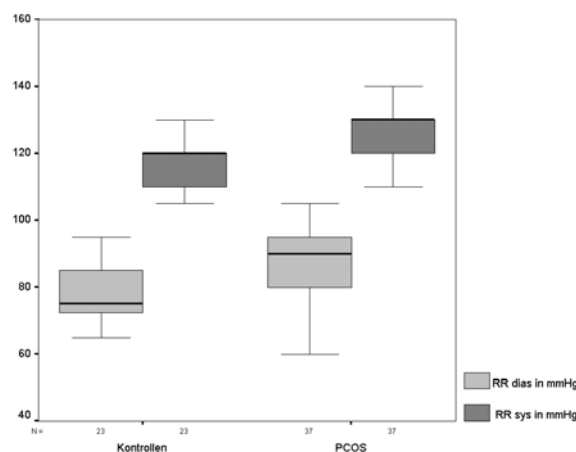
Für alle erhobenen klinischen Merkmale ergaben sich erwartungsgemäß signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. So litten nur 17,4% der Kontrollpatientinnen unter einer **Akne**, bei den PCOS-Patientinnen waren es 36%. Bei 13% der Kontrollpersonen war ein **Hirsutismus** nachweisbar, während PCOS-Patientinnen in insgesamt 64,1% betroffen waren.

Für den **BMI** fanden wir beim Vergleich der Medianwerte mit  $p = 0,009$  einen signifikanten Unterschied zwischen der PCOS- und der Kontrollgruppe. Der Median des BMI lag für die Kontrollgruppe bei 22, bei den Patientinnen mit PCOS bei 26 (Abb 3.1). Zwischen den PCOS-Patientinnen mit bzw. ohne vorangegangenes Überstimulationssyndrom ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Der Vergleich der Medianwerte des **Blutdrucks** erbrachte für die Gruppe aller PCOS-Patientinnen gegenüber der Kontrollgruppe mit  $p=0,01$  signifikant höhere Werte sowohl für den systolischen ( $\text{med}_{\text{PCOS}} = 130 \text{ mmHg}$ ;  $\text{med}_{\text{K}} = 120 \text{ mmHg}$ ) als auch für den diastolischen Druck ( $\text{med}_{\text{PCOS}} = 90 \text{ mmHg}$ ;  $\text{med}_{\text{K}} = 75 \text{ mmHg}$ ) (Abb 3.2). Dabei lag die Zahl der Fälle mit Grenzwerthypertonie (RR zwischen 140/90 und 160/95 mmHg) in der Kontrollgruppe bei 1 (4,5%), in der gesamten PCOS-Gruppe dagegen bei 11 (29%). Hinweise auf eine bestehende manifeste Hypertonie ( $\text{RR} > 160/95 \text{ mmHg}$ ) fanden wir in der Kontrollgruppe nicht, in der PCOS-Gruppe hingegen bei 4 Patientinnen (3 x PCOS und 1x PCOS/ OHSS).



**Abb. 3.1: Verteilung der Body Mass Indices in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe aller PCOS-Patientinnen.**



**Abb. 3.2: Verteilung der diastolischen und systolischen Blutdruckwerte in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe aller PCOS-Patientinnen.**

### 3.1.3 Biochemische Befunde

#### 3.1.3.1 LHRH-Test

Die Basalspiegel an **Luteinisierendem Hormon** waren bei den PCOS-Patientinnen und besonders bei denen mit anamnestischem OHSS im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell erhöht. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 3.3). Gleiches gilt für die Serumspiegel 30 und 60 min nach Stimulation durch LHRH. Der Quotient der LH-Spiegel 30 min nach Stimulation im Vergleich zu den Werten vor der Stimulation ( $LH_{30}/LH_0$ ) war jedoch in der Gruppe der Patientinnen mit OHSS signifikant niedriger als in der Gruppe derer ohne OHSS ( $p = 0,028$ ) (Abb. 3.4.).

Bei der Messung der Werte für das **Follikelstimulierende Hormon** ergaben sich signifikant niedrigere Basalwerte in der Gruppe der PCOS-Patientinnen gegenüber den Kontrollen ( $p=0,045$ ), wobei die Spiegel bei den Frauen mit vorausgegangenem OHSS deutlich höher lagen als bei den restlichen PCOS-Patientinnen ( $p=0,023$ ; Abb. 3.5). Für die Werte 30 und 60 min nach Stimulation war eine ähnliche Tendenz erkennbar, allerdings waren die Unterschiede hier nicht signifikant.

Die **Quotienten LH/FSH** zwischen sowohl den Basalwerten für LH und FSH als auch den 30 min-Werten waren bei den PCOS-Patientinnen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ( $p = 0,003$  bzw.  $p = 0,017$ ). Zwischen den PCOS-Patientinnen mit bzw. ohne OHSS zeigte sich keine signifikante Differenz (Abb. 3.6).

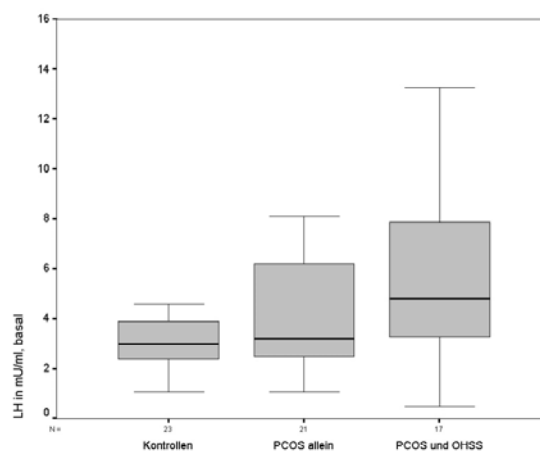


Abb. 3.3: Verteilung der LH-Basalwerte der drei Gruppen.

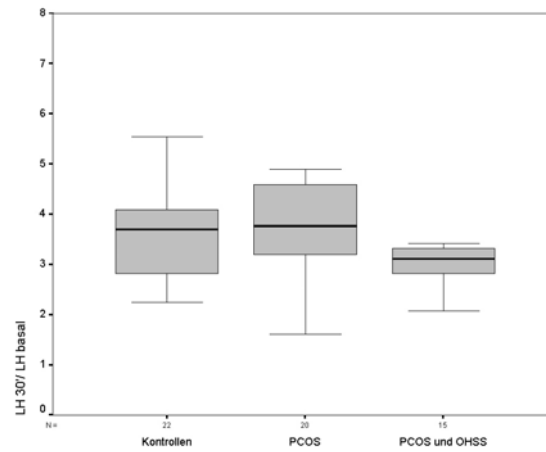


Abb. 3.4: Darstellung der Quotienten aus LH<sub>30</sub> und LH<sub>0</sub> als Ausdruck des Anstiegs der LH-Werte p. stim. der drei Gruppen.

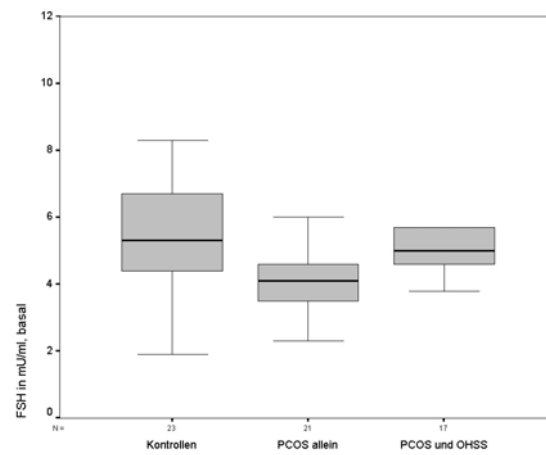


Abb. 3.5: Verteilung der FSH-Basalwerte in den drei verschiedenen Gruppen.

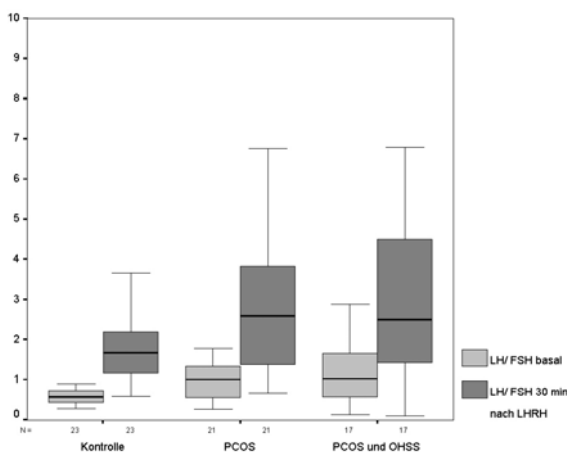


Abb. 3.6: Darstellung der Quotienten aus LH und FSH jeweils basal bzw. 30 min p.stim. in den drei verschiedenen Gruppen.

### 3.1.3.2 ACTH-Test

Die Werte für **freies Testosteron** und **Gesamttestosteron** waren in der PCOS-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,004$  bzw.  $p = 0,024$ ). Bezüglich des Gesamttestosterons wurden gegenüber der PCOS-Gruppe signifikant niedrigere Werte für die Untergruppe der OHSS-Patientinnen registriert ( $p = 0,023$ ), was für freies Testosteron nicht nachweisbar war (Abb. 3.7 und 3.8).

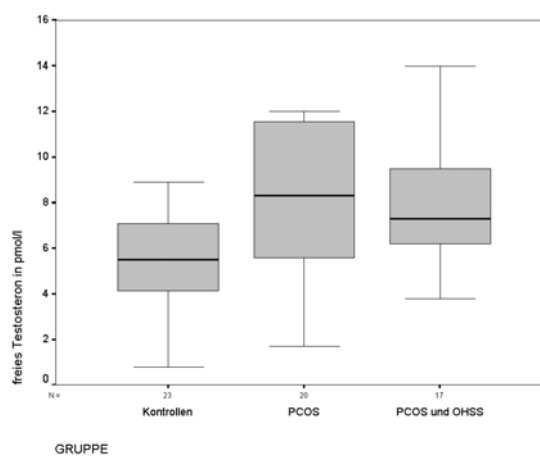


Abb. 3.7: Verteilung der Serumwerte für freies Testosteron in den drei Gruppen

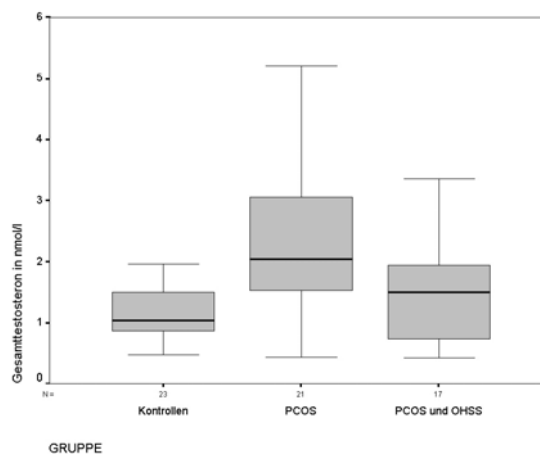
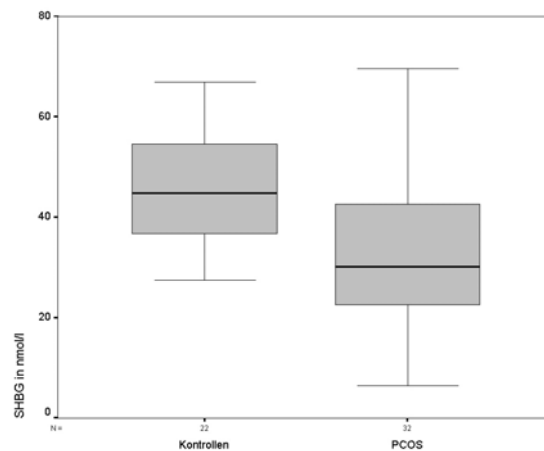


Abb. 3.8: Verteilung der Serumwerte für Gesamttestosteron in den drei Gruppen

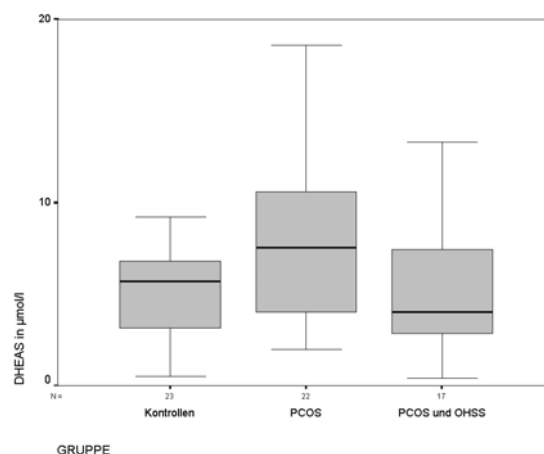
Auch für das Transportprotein der Sexualsteroiden, das **SHBG**, zeigten sich eindeutige Differenzen zwischen PCOS- und Kontrollgruppe. Dabei war der Median der PCO-Gesamtgruppe mit 30,1 nmol/l signifikant niedriger ( $p = 0,003$ ) als der Median in der

Kontrollgruppe mit 44,8 nmol/l (Abb. 3.9). Zwischen den PCOS-Patientinnen mit und ohne OHSS war kein Unterschied feststellbar.



**Abb. 3.9:** Verteilung der Serumwerte für SHBG in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe aller PCOS-Patientinnen.

Bei der Untersuchung der **DHEA**-Spiegel erreichte nur der Vergleich zwischen den 60 Minuten-Werten der PCOS- bzw. Kontrollgruppe statistische Signifikanz ( $p = 0,035$ ), wobei zusätzlich in der OHSS-Gruppe tendenziell niedrigere Werte vorherrschten als in der Gruppe mit PCOS ohne OHSS. Der Unterschied zwischen den beiden PCOS-Untergruppen bestätigte sich signifikant auch in Bezug auf **DHEAS** ( $p = 0,021$ ) (Abb. 3.10).



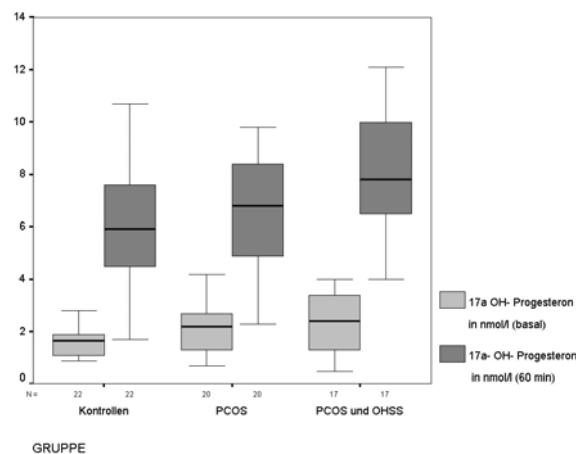
**Abb. 3.10:** Verteilung der Basalwerte für DHEAS im Serum in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe der PCOS-Patientinnen ohne bzw. mit anamnestischem OHSS.

Im Hinblick auf **17 $\alpha$ -OHP** war für basale und stimulierte Werte ebenfalls eine Tendenz zu erhöhten Werten in der PCOS-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe sichtbar. Dabei schienen

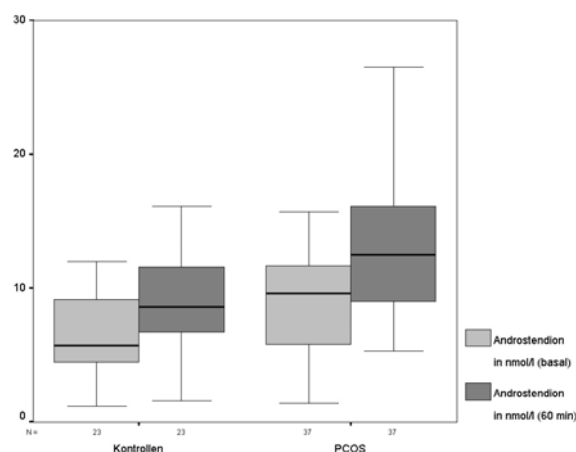


die Werte in der OHSS-Gruppe in noch stärkerem Maße erhöht zu sein (Abb. 3.11). Diese Unterschiede erreichen jedoch keine statistische Signifikanz.

Für **Androstendion** ergaben sich sowohl bei den basalen als auch bei den durch ACTH-Gabe stimulierten Spiegeln signifikant höhere Werte für die PCOS-Gesamtgruppe beim Vergleich mit der Kontrollgruppe ( $p = 0,015$  bzw.  $p = 0,001$ ). Zwischen PCOS-Patientinnen mit bzw. ohne OHSS war kein Unterschied feststellbar (Abb. 3.12).



**Abb. 3.11: Verteilung der basalen bzw. stimulierten Serumwerte für 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron in den drei Gruppen.**



**Abb. 3.12: Verteilung der Androstendionwerte basal bzw. 60 min p. stim. in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe aller PCOS-Patientinnen.**

Für das **21-DOF** ergaben sich sowohl hinsichtlich der Basal- wie auch der stimulierten Werte kein signifikanter Unterschied zwischen den Medianwerten (**21-DOF**<sub>0</sub>: med<sub>K</sub> = 0,18 nmol/l;

$\text{med}_{\text{PCOS}} = 0,16 \text{ nmol/l}$ ;  $p = 0,4$ ; **21-DOF<sub>60</sub>**:  $\text{med}_K = 0,83 \text{ nmol/l}$ ;  $\text{med}_{\text{PCOS}} = 0,68 \text{ nmol/l}$ ,  $p = 0,1$ ).

Um Hinweise auf eine partielle 21-Hydroxylase-Defizienz zu erhalten, betrachteten wir die Werte für 21-DOF, 17 $\alpha$ -OHP bzw. die Quotienten aus 21-DOF und Cortisol sowie 17 $\alpha$ -OHP und Cortisol jeweils vor und 60 min nach der ACTH-Stimulation. Die Verteilung der Werte unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Als auffällig galten diejenigen Werte, die über der 90. Perzentile der für die Kontrollgruppe ermittelten Werte liegen. Für **21-DOF<sub>0</sub>** lag die 90. Perzentile bei 1,08 mmol/l; für **21-DOF<sub>60</sub>** bei 1,98 mmol/l; für **17 $\alpha$ -OHP<sub>0</sub>** bei 3,88 nmol/l, für **17 $\alpha$ -OHP<sub>60</sub>** bei 10,58 nmol/l. Als Grenzwert für den Quotienten **21-DOF<sub>0</sub>/ F<sub>0</sub>** galt 0,63; für **21-DOF<sub>60</sub>/ F<sub>60</sub>** 0,42, für **17 $\alpha$ -OHP<sub>0</sub>/ F<sub>0</sub>** 1,59; für **17 $\alpha$ -OHP<sub>60</sub>/ F<sub>60</sub>** lag er bei 1,94.

Auffällige biochemische Befunde im Sinne einer überschießenden 17 $\alpha$ -OHP bzw. 21-DOF-Antwort gegenüber einem mäßigen Cortisol-Anstieg nach Stimulation durch ACTH zeigten nur 4 der PCOS-Patientinnen, davon 3 mit OHSS. Einen über die 90. Perzentile erhöhten Quotienten aus den Basalwerten aus 17 $\alpha$ -OHP bzw. 21-DOF und Cortisol fanden wir bei weiteren 4 PCOS-Patientinnen. Bei diesen insgesamt 8 PCOS-Patientinnen stellten wir in 4 Fällen heterozygote Mutationen im *CYP21A2*-Gen fest.

Bei 7 weiteren PCOS-Patientinnen (4 davon mit OHSS) fanden wir oberhalb der 90-Perzentile liegende Werte für 17 $\alpha$ -OHP bzw. 21-DOF als möglichen Hinweis auf eine partielle 21-Hydroxylase-Defizienz. Die Quotienten aus beiden Werten und Cortisol sind jedoch bei diesen Patientinnen nicht erhöht. 2 dieser Patientinnen waren Trägerinnen heterozygoter Mutationen im *CYP21A2*-Gen.

Außerdem wiesen 2 Kontrollpatientinnen auffällige biochemische Befunde auf. Beide waren Trägerinnen heterozygoter Mutationen.

### 3.1.3.3 Metabolische Parameter

Die **Serumleptinspiegel** der PCOS-Patientinnen waren mit  $p = 0,004$  signifikant höher als die der Kontrollpatientinnen. Zwischen den PCOS-Patientinnen mit und ohne OHSS in der

Anamnese war die Tendenz zu höheren Werten bei Patientinnen mit Überstimulationssyndrom zu erkennen. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Dabei lag der Median der Leptinwerte in der Kontrollgruppe bei 9,5 ng/ml, in der PCOS-Gruppe bei 11,9 ng/ml und in der OHSS-Gruppe bei 17,0 ng/ml (Abb. 3.13).

Darüber hinaus war ein Zusammenhang zwischen den Leptinwerten und dem Grad der Zyklusstörung erkennbar. Der Median für Leptin lag bei den amenorrhöischen Frauen bei 15,3 ng/ml, bei den oligomenorrhöischen bei 12,0 ng/ml und bei den Frauen mit regelmäßigem Zyklus bei 9,3 ng/ml (Abb. 3.14).

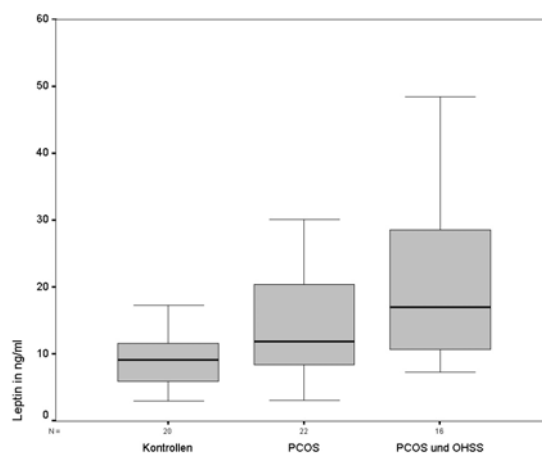


Abb. 3.13: Verteilung der Serumleptinspiegel in den drei verschiedenen Gruppen.

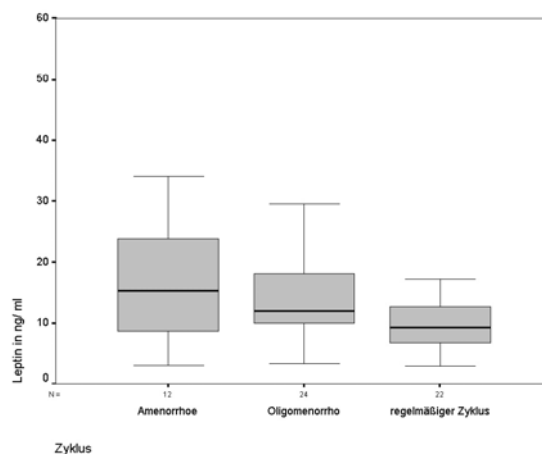


Abb. 3.14: Verteilung der Serumleptinspiegel bei verschieden stark ausgeprägter Zyklusstörung.

Die **Nüchternblutzuckerwerte** sowie die **Insulin-** und **IGF-1-Spiegel** unterschieden sich nicht zwischen den verschiedenen Patientengruppen (**BZ**:  $\text{med}_K = 95 \text{ mg/dl}$ ;  $\text{med}_{PCOS} = 99,5$

mg/ dl  $p = 0,2$ ; **Insulin**:  $\text{med}_K = 9 \mu\text{U/ ml}$ ;  $\text{med}_{\text{PCOS}} = 9,6 \mu\text{U/ ml}$ ;  $p = 0,2$ ; **IGF-I**:  $\text{med}_K = 169 \text{ ng/ ml}$ ,  $\text{med}_{\text{PCOS}} = 164,5 \text{ ng/ ml}$ ;  $p = 0,7$ ).

### 3.1.4 Korrelationsanalyse

#### Zyklusstörungen

Der Grad der Zyklusstörung korrelierte bei unseren Patientinnen sehr stark mit den Spiegeln an Gesamttestosteron ( $r = 0,419$ ;  $p = 0,001$ ), freiem Testosteron ( $r = 0,364$ ;  $p = 0,004$ ) und SHBG ( $r = -0,34$ ;  $p = 0,012$ ). Außerdem bestand ein Zusammenhang mit den basalen DHEA-, DHEAS- und Androstendionwerten, nicht dagegen mit den Spiegeln an  $17\alpha\text{-OHP}$  ( $r_{\text{DHEA}} = 0,32$ ,  $p = 0,012$ ;  $r_{\text{DHEAS}} = 0,344$ ,  $p = 0,007$ ;  $r_{\text{Androst}} = 0,362$ ;  $p = 0,004$ ).

Bei der Korrelation zwischen dem Grad der Zyklusstörungen und dem BMI wurde zwar keine Signifikanz erreicht, aber es war die Tendenz erkennbar, dass ein höherer BMI auch mit einer Zunahme der Zyklusstörungen einhergeht. So lag der Median für den BMI in der Gruppe der amenorrhöischen Frauen bei 26,3, bei den oligomenorrhöischen Frauen bei 24,5 und bei den Patientinnen mit regelmäßiger Menstruation bei 22,6.

#### Blutdruck

Sowohl der systolische als auch der diastolische Blutdruck korrelierten auf hohem Niveau mit den Spiegeln an freiem Testosteron (für  $\text{RR}_{\text{sys}}$ :  $r = 0,363$ ;  $p = 0,005$  und für  $\text{RR}_{\text{diast}}$ :  $r = 0,424$ ;  $p = 0,001$ ). Darüber hinaus bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem diastolischen Druck und Insulin ( $r = 0,402$ ;  $p = 0,002$ ) bzw. SHBG ( $r = -0,295$ ;  $p = 0,034$ ). Auch für den Body Mass Index deutete sich ein Einfluss auf den diastolischen Druck an, dieser war allerdings nicht signifikant ( $p = 0,062$ ).

#### Hirsutismus

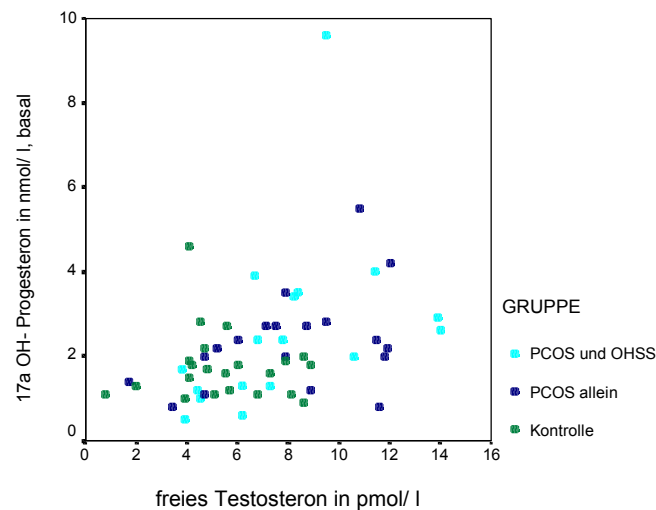
Der Grad des Hirsutismus korrelierte auf signifikantem Niveau mit den Serumspiegeln für freies Testosteron ( $r = 0,347$ ;  $p = 0,007$ ), für SHBG ( $r = -0,281$ ;  $p = 0,04$ ), für Androstendion ( $r = 0,365$ ;  $p = 0,004$ ) und  $17\alpha\text{-Hydroxyprogesteron}$  ( $r = 0,337$ ;  $p = 0,009$ ).

#### Sexualsteroid

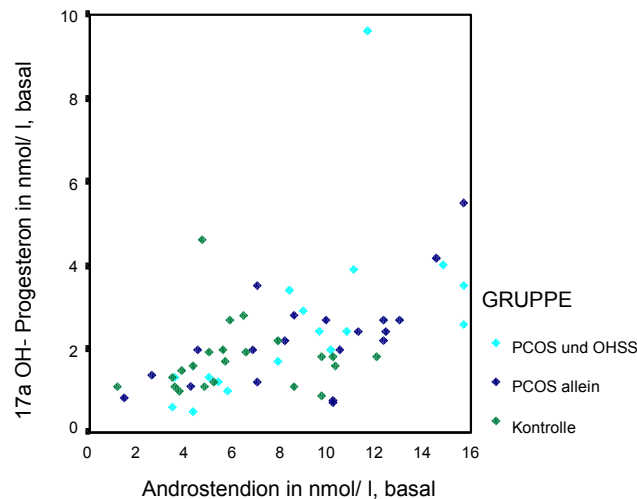
Innerhalb der Sexualsteroid korrelierten die Spiegel für freies Testosteron gleichermaßen mit DHEA ( $r = 0,534$ ;  $p < 0,0005$ ) und DHEAS ( $r = 0,394$ ;  $p = 0,002$ ) wie auch mit Androstendion ( $r = 0,711$ ;  $p < 0,0005$ ) und  $17\alpha\text{-OHP}$  ( $r = 0,447$ ,  $p < 0,0005$ ). Abbildung 3.15

zeigt diesen Zusammenhang beispielhaft für  $17\alpha$ -OHP. Zwischen Androstendion und  $17\alpha$ -OHP bestand sowohl bei den basalen als auch bei den stimulierten Werten ein enger Zusammenhang ( $r = 0,594$ ;  $p < 0,0005$  bzw.  $r = 0,44$ ;  $p < 0,0005$ ) (Abb 3.16). Zwischen den Spiegeln an DHEA und seinem Sulfat, dem DHEAS, fanden wir bei unseren Probandinnen eine enge Beziehung ( $r = 0,6$ ;  $p < 0,0005$ ).

Die Werte für Testosteron und  $17\alpha$ -OHP korrelierten in der Kontrollgruppe nicht. In der Gruppe der PCOS-Patientinnen bestand dagegen ein enger Zusammenhang zwischen freiem Testosteron und den Basalwerten für  $17\alpha$  OHP ( $r = 0,526$ ;  $p = 0,001$ ) sowie dem Anstieg des  $17\alpha$ -OHP nach ACTH-Stimulation ( $r = -0,568$ ;  $p < 0,0005$ ). Dieser Zusammenhang war in der Gruppe der Patientinnen mit anamnestischen OHSS besonders stark ausgeprägt ( $r = 0,7$ ;  $p = 0,002$  bzw.  $r = -0,59$ ;  $p = 0,012$ ).



**Abb. 3.15: Zusammenhang zwischen den basalen Serumwerten für  $17\alpha$ -OH Progesteron und freiem Testosteron.**

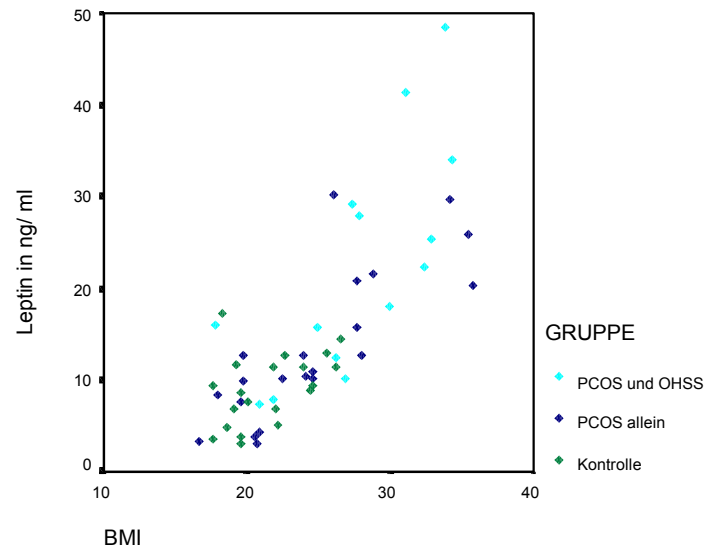


**Abb. 3.16: Zusammenhang zwischen den basalen Serumwerten für 17 $\alpha$ -OH Progesteron und Androstendion.**

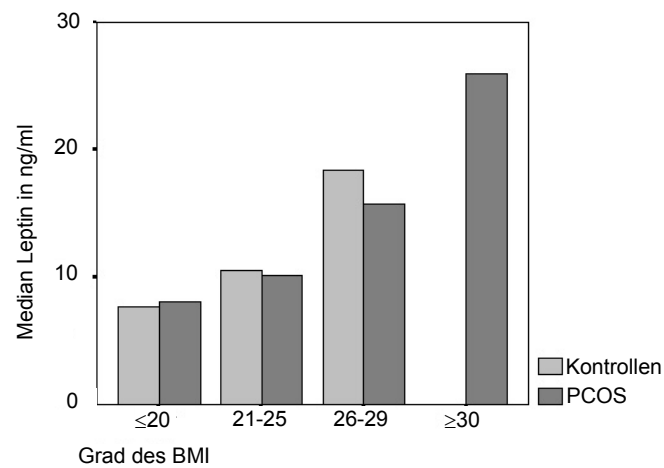
#### Metabolische Parameter

Zwischen dem Body Mass Index, den Serumleptin- und Insulinspiegeln sowie dem SHBG existierte ein enger Zusammenhang.

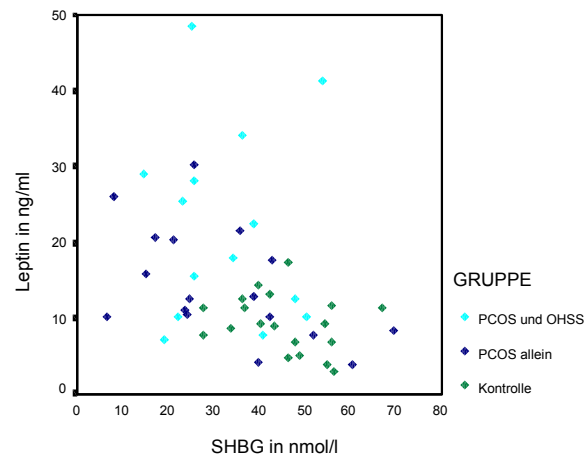
So korrelierte Leptin auf hohem Niveau mit dem BMI ( $r = 0,661$ ;  $p < 0,005$ ) (Abb. 3.17), bei etwa gleichem BMI unterschieden sich die Medianwerte für Leptin zwischen PCOS-Gruppe und Kontrollen kaum (Abb. 3.18). Außerdem bestand eine Korrelation zwischen Leptin und Insulin ( $r = 0,534$ ;  $p < 0,0005$ ) und dem SHBG ( $r = -0,466$ ;  $p = 0,001$ ) (Abb. 3.19). Die Werte für den BMI korrelierten ebenso mit Insulin ( $r = 0,421$ ;  $p = 0,002$ ) wie mit freiem Testosteron bzw. DHEAS ( $r = 0,311$ ;  $p = 0,018$  bzw.  $r = 0,31$ ;  $p = 0,02$ ). Des Weiteren fanden wir eine umgekehrte Proportionalität zwischen dem SHBG und dem BMI ( $r = -0,491$ ;  $p < 0,0005$ ) bzw. den Insulinspiegeln ( $r = -0,395$ ;  $p = 0,003$ ).



**Abb. 3.17: Zusammenhang von Serumleptinspiegeln und Body Mass Indices.**



**Abb. 3.18: Medianwerte der Serumleptinspiegel bei verschiedenen Body Mass Indices, Vergleich zwischen Kontroll- und PCOS-Patientinnen.**



**Abb. 3.19: Zusammenhang von Serumleptin- und SHBG-Spiegeln.**

Ein direkter Zusammenhang zwischen den Werten für die oben beschriebenen Parameter mit den Basalspiegeln an LH und FSH oder dem Quotienten aus LH und FSH konnte nur für  $17\alpha$ -OHP nachgewiesen werden. Dabei korrelierte das  $17\alpha$ -OHP mit dem Quotienten aus LH und FSH ( $r = 0,308$ ;  $p = 0,018$ ).

## 3.2 Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen

### 3.2.1 Ergebnisse der Southern-Blot-Analyse

Vor der Untersuchung des *CYP21A2*-Gens auf Punktmutationen stand die Untersuchung hinsichtlich großer Deletionen oder Genkonversionen. Dafür nutzten wir die Techniken der Southern-Blot-Analyse.

Die Trennung von *A1*- und *A2*-Gen gelang durch den Einsatz der Restriktionsenzyme Taq I und Bgl II. Sie ermöglichen die getrennte Darstellung beider Genbereiche durch spezifische Spaltung, die mittels anschließender Hybridisierung mit der Plasmidsonde p21c/3c sichtbar gemacht werden konnten. Unter Einsatz der Endonuklease Taq I wurde ein 3,2 kb großes Fragment für das *CYP21A1*-Gen und ein 3,7 kb großes Fragment für das *CYP21A2*-Gen dargestellt. Bei der Spaltung mit Bgl II erhielten wir ein 12 kb großes Fragment für das *CYP21A1*-Gen und ein 10 kb großes Fragment für das *CYP21A2*-Gen.

Produkte des unequal crossing over sind 30 kb-Deletionen oder 30 kb-Duplikationen.



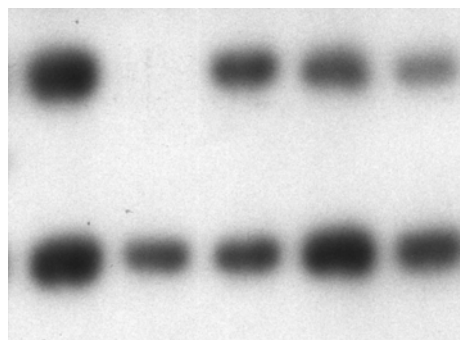
Die 30 kb große Deletion reicht vom 3'-Ende des *CYP21A1*-Gens bis zum 5'-Ende des *CYP21A2*-Gens und erzeugt im homozygoten Fall ein nicht funktionsfähiges, im heterozygoten Fall ein eingeschränkt funktionsfähiges *CYP21A1/ CYP21A2*-Hybridgen.

Homozygote 30 kb-Deletionen stellen sich in der Southern Blot Analyse als fehlende Banden und heterozygote 30 kb-Deletionen als vom Wildtyp abweichendes Verhältnis der Bandenstärken dar.

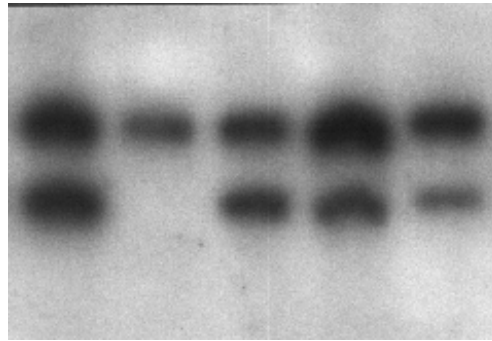
Homozygote Deletionen des *CYP21A1*-Gens stellen sich als fehlende Banden des 3,2 bzw. 12kb großen Fragmentes dar, homozygote *A2*-Gen-Deletionen als fehlende 3,7 bzw. 10kb große Fragmente.

Bei heterozygoten Deletionen sind die Banden der entsprechenden Fragmente mit abgeschwächter Intensität sichtbar.

Für die Auswertung der Southern-Blot-Analyse mit Hilfe des Phospho-Imager-Systems nutzten wir für die Entwicklung der Phospho-Imager-Platte das Gerät FUJIX BAS 2000 der Firma Fuji. Die Auswertung der Daten erfolgte über das Programm TINA (Raytest), Version 2.09. Die Autoradiogramme der Southern-Blot-Analyse einer heterozygoten bzw. einer homozygoten A1-Deletion im Vergleich zu einer Kontrolle zeigen die Abbildungen 3.20 und 3.21.



**Abb. 3.20:** Autoradiogramm der 3,2 bzw. 3,7 kb grossen Fragmente. An Position 2 Nachweis einer homozygoten *CYP21A1*-Deletion (fehlende 3,2kb- Bande); in Position 5 Nachweis einer heterozygoten *CYP21A1*- Deletion (abgeschwächte 3,2kb-Bande).



**Abb. 3.21:** Autoradiogramm der 10 bzw. 12kb großen Fragmente. An Position 2 Nachweis einer homozygoten *CYP21A1*-Deletion (fehlende 12kb- Bande); in Position 5 Nachweis einer heterozygoten *CYP21A1*- Deletion (abgeschwächte 12kb-Bande).

Wir fanden bei insgesamt 15 Patientinnen heterologe *CYP21A1*- Deletionen, davon stammten 4 Patientinnen aus der Kontrollgruppe und bei 11 Patientinnen war ein PCOS nachgewiesen. Das entspricht einer Frequenz von 17% für die Kontrollgruppe und 28% für die Gruppe der Patientinnen mit polyzystischen Ovarien.

Die Ergebnisse der Southern-Blot-Analyse für die einzelnen Patientinnen sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

**Tab. 3.1:** Ergebnisse der Southern-Blot-Analyse.

**Gruppe 1:** Kontrollpatientinnen

**Gruppe 2:** Patientinnen mit PCOS

**Gruppe 3:** Patientinnen mit PCOS und OHSS

Pat.- Nr.	Pat.- Gruppe	Bgl II 12 kb : 10 kb (Verhältnis der Intensität der Banden)	Taq I 3,2 kb : 3,7 kb (Verhältnis der Intensität der Banden)	Interpretation
1	1	1 : 1	1 : 1	
2	1	1 : 1	1 : 1	
3	1	1 : 1	1 : 1	
4	1	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
5	1	1 : 1	1 : 1	
6	1	1 : 1	1 : 1	
7	1	1 : 1	1 : 1	
8	1	1 : 1	1 : 1	
10	1	1 : 1	1 : 1	
11	3	1 : 1	1 : 1	

12	3	1 : 1	1 : 1	
13	3	1 : 1	1 : 1	
14	3	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
15	3	1 : 1	1 : 1	
16	3	1 : 1	1 : 1	
17	3	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
18	2	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
19	2	1 : 1	1 : 1	
20	2	1 : 1	1 : 1	
21	2	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
22	2	1 : 1	1 : 1	
23	2	1 : 1	1 : 1	
24	2	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
25	2	1 : 1	1 : 1	
26	2	1 : 1	1 : 1	
27	2	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
28	2	1 : 1	1 : 1	
29	2	1 : 1	1 : 1	
30	2	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
31	2	1 : 1	1 : 1	
32	2	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
33	2	1 : 1	1 : 1	
34	2	1 : 1	1 : 1	
35	3	1 : 1	1 : 1	
37	3	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
38	1	1 : 1	1 : 1	
39	1	1 : 1	1 : 1	
40	1	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
41	2	1 : 1	1 : 1	
42	2	0 : 1	0 : 1	homozyg. A1-Deletion
43	3	1 : 1	1 : 1	
45	1	1 : 1	1 : 1	
46	3	1 : 1	1 : 1	

47	3	1 : 1	1 : 1	
48	1	1 : 1	1 : 1	
49	1	1 : 1	1 : 1	
50	1	1 : 1	1 : 1	
51	2	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
52	1	1 : 1	1 : 1	
53	1	1 : 1	1 : 1	
54	1	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
55	2	1 : 1	1 : 1	
57	1	1 : 1	1 : 1	
58	3	1 : 1	1 : 1	
59	3	1 : 1	1 : 1	
60	1	1 : 2	1 : 2	heterozyg. A1-Deletion
61	1	1 : 1	1 : 1	
62	3	1 : 1	1 : 1	
63	1	1 : 1	1 : 1	
64	3	1 : 1	1 : 1	
65	2	1 : 1	1 : 1	
69	3	1 : 1	1 : 1	

### 3.2.2 Ergebnisse des Mutationsscreenings

Nach spezifischer Amplifikation des *CYP21A2*-Gens mit 3 Primerpaaren wurden 14 Sequenzierprimer mit dem Computerprogramm OLIGO ausgewählt und anschließend für die automatische Sequenzierung eingesetzt. Auf diese Weise konnte die gesamte Sequenz des *CYP21A2*-Gens erfasst und auf Mutationen und Polymorphismen untersucht werden. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit einem speziell dafür erstellten Unix-Programm.

Die Tabellen 3.2. bis 3.6. zeigen die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen.

In dem von uns untersuchten Kollektiv fanden wir in insgesamt 11 Fällen heterozygote Mutationen, die bekanntermaßen im homozygoten Zustand ein AGS unterschiedlicher Ausprägung verursachen. Dabei handelt es sich in 9 Fällen um PCOS- Patientinnen, das

entspricht einer Frequenz an heterozygoten Mutationen in dieser Gruppe von 23,1%. Ein nennenswerter Unterschied zwischen beiden Gruppen der PCOS- Patientinnen ist nicht nachweisbar. 18% der PCOS- Patientinnen ohne OHSS und 29% derjenigen mit anamnestischem OHSS weisen heterozygote Mutationen auf. Demgegenüber stehen nur 2 Trägerinnen heterozygoter Mutationen in der Kontrollgruppe, entsprechend 8,7% der Kontrollpatientinnen.

Pathologische biochemische Befunde im Sinne eines oberhalb der 90. Perzentile der Kontrollgruppe liegenden Quotienten aus  $17\alpha$ -OHP bzw. 21-DOF und Cortisol fanden wir nur bei 5 der heterozygoten Mutationsträgerinnen, wobei eine dieser Patientinnen der Kontrollgruppe angehört. Zwei weitere PCOS- Patientinnen (davon eine mit OHSS) mit nachgewiesener Mutation fallen lediglich durch einen erhöhten Basalwert für 21-DOF bzw. einen erhöhten  $17\alpha$ -OHP-Wert nach ACTH-Stimulation auf. Eine Kontrollpatientin mit heterozygoter Mutation weist sowohl erhöhte Werte für  $17\alpha$ -OHP und 21-DOF nach ACTH-Stimulation wie auch einen erhöhten  $17\alpha$ -OHP- Basalwert auf.

Die folgenden beiden Tabellen (Tab 3.2. und 3.3.) geben Auskunft über molekulargenetische Details der detektierten Mutationen und ihre Verteilung in dem von uns untersuchten Kollektiv.

**Tab. 3.2: Mutationen, die in unserem Patientenkollektiv in heterozygotem Zustand auftraten und deren klinische Auswirkung bei homozygotem Auftreten**

Nr.	Name	Position	Intron/ Exon	Basen- austausch	Aminosäure- austausch	klinische Manifestation bei Homozygotie	Quelle
1		1675	vor Exon 1	C→T		LO AGS	64
2	P30L	1767	Exon 1	C→T	Pro→Leu	NC AGS	64
3	I2 Splice	2331	Intron 2	A/C→G		abnormal splicing SW/ SV AGS	64,65, 66
4	V281L	3362	Exon 7	G→T	Val→Leu	NC AGS	65,66
5	Q318X	3673	Exon 8	C→T		Nonsense mutation SW AGS	64,65, 66

**Tab. 3.3: Heterozygote Mutationen des *CYP21A2*-Gens und wichtige biochemische Parameter.**

**Q1:  $17\alpha\text{OHP}_0/\text{F}_0$  : Quotient aus  $17\alpha\text{OHP}$  und Cortisol vor Stimulation durch ACTH**

**Q2:  $17\alpha\text{OHP}_{60}/\text{F}_{60}$  : Quotient aus  $17\alpha\text{OHP}$  und Cortisol 60 min nach Stimulation durch ACTH**

**Q3:  $21\text{DOF}_0 \times 100/\text{F}_0$  : Quotient aus 21 DOF und Cortisol vor Stimulation durch ACTH**

**Q4:  $21\text{DOF}_{60} \times 100/\text{F}_{60}$  : Quotient aus 21 DOF und Cortisol 60 min nach Stimulation durch ACTH**

**\*Werte oberhalb der 90. Perzentile der Kontrollgruppe**

Pat. -Nr.	Grupp e	Mutatio n	Allel e	$17\alpha\text{OH}$ $\text{P}_0$	$17\alpha\text{OHP}_6$ $_0$	21 $\text{DOF}_0$	21 $\text{DOF}_{60}$	Q1	Q2	Q3	Q4
12	3	1767	C/T	0,60	7,40	0,10	0,61	0,23	0,53	0,04	0,04
25	2	1767	C/T	1,20	5,00	0,07	0,14	0,26	0,46	0,02	0,01
31	2	1675	C/T	2,40	9,80	0,12	0,51	1,30	2,50 *	0,06	0,13
32	2	1767	C/T	4,90 <sup>*</sup>	9,40	0,17	0,86	1,60 *	1,70	0,06	0,16
33	3	1767	C/T	5,50	9,10	1,36 <sup>*</sup>	1,13	2,25 *	0,85	0,56	0,11
37	3	1767	C/T	1,20	4,20	0,74	1,11	0,21	0,42	0,13	0,11
41	2	1767	C/T	2,80	4,80	1,19 <sup>*</sup>	0,72	0,69	0,64	0,29	0,10
46	3	2331	C/G	9,60 <sup>*</sup>	9,60	0,25	3,54 <sup>*</sup>	3,65 *	1,24	0,1	0,46 *
61	1	3673	C/T	6,00 <sup>*</sup>	15,7 <sup>*</sup>	0,33	2,79 <sup>*</sup>	0,87	1,13	0,05	0,20
63	1	1767	C/T	4,60 <sup>*</sup>	10,7 <sup>*</sup>	0,10	0,62	1,68 *	1,31	0,04	0,08
64	3	3362	G/T	3,50	12,1 <sup>*</sup>	0,15	1,27	1,39	1,54	0,06	0,16

Bei der lückenlosen Darstellung der Gensequenz stießen wir auf eine Vielzahl weiterer heterozygoter Sequenzabweichungen, die nach unserem Kenntnisstand bisher in der Literatur nicht beschrieben worden sind. Sie sind im einzelnen gemeinsam mit den dazugehörigen biochemischen Parametern in der folgenden Tabelle (Tab. 3.4) aufgeführt.

Zu oberhalb der 90. Perzentile liegenden Quotienten aus 21-DOF und Cortisol führt lediglich der heterozygote Basenaustausch in Intron 4 bei einer PCOS-Patientin mit OHSS. Bei derselben Patientin besteht gleichzeitig eine heterozygote Splice- Mutation in Intron 2. Bei

zwei weiteren Patientinnen fanden wir bei Basenaustausch in Intron 8 pathologisch erhöhte Quotienten aus  $17\alpha$ -OHP und Cortisol. Bei einer dieser Patientinnen ist gleichzeitig eine heterozygote Mutation in Exon 1 nachzuweisen.

**Tab. 3.4: Bisher nicht beschriebene Sequenzabweichungen im *CYP21A2*-Gen bei unseren Patientinnen und dazugehörige Laborparameter:**

**Q1: Quotient aus 17 $\alpha$ -OHP und Cortisol vor Stimulation durch ACTH**

**Q2: Quotient aus 17 $\alpha$ -OHP und Cortisol 60 min nach Stimulation durch ACTH**

**Q3: Quotient aus 21- DOF x 100 und Cortisol vor Stimulation durch ACTH**

**Q4: Quotient aus 21- DOF x 100 und Cortisol 60 min nach Stimulation durch ACTH**

**\*Werte oberhalb der 90. Perzentile der Kontrollgruppe**

Position	Intron/ Exon	Basen- austausch	Aminosäure austausch	Pat. Nr.	Gruppe	Q1	Q2	Q3	Q4
1491	vor Exon 1	A-Del		41	2	0,69	0,64	0,29	0,1
1598	vor Exon 1	A→C		30	2	1,37	1,2	0,11	0,06
				35	3	1,37	0,95	0,07	0,19
				49	1	0,55	0,66	0,04	0,12
1719	Exon 1	G→C	Gly→Ala	22	2	0,7	0,78	0,05	0,03
1798	Exon 1	G→C	Leu→Leu	5	1	0,59	1,25	0,07	0,1
1950	Intron 1	T-Del		21	2	0,54	1,12	0,04	0,18
2266	Intron 2	G→A		35	3	1,37	0,95	0,07	0,19
				49	1	0,55	0,65	0,04	0,12
				61	1	0,87	1,13	0,05	0,2
2365	Exon 3	G-Ins		42	2	0,49	0,61	0,61	0,25
2371	Exon 3	G→C	Pro→Pro	60	1	0,75	0,72	0,04	0,06
2782	Intron 4	C→A		16	3	0,16	0,48	0,02	0,07
2789	Intron 4	T→C		46	3	3,65*	1,24	0,1	0,46*
				47	3	0,76	1,02	0,11	0,11
2862	Exon 5	2G→3G		12	3	0,23	0,53	0,04	0,04
2917	Intron 5	G→A		8	1	0,9	0,54	0,35	0,05
3547	Intron 7	G→A		10	1	0,62	0,82	0,1	0,13
3885	Intron 8	G→A		32	2	1,6*	1,7	0,06	0,16
				40	1	1,6*	0,8		
4047	Intron 9	G→A		64	3	1,39	1,54	0,06	0,16
				65	2	0,53	0,64	0,06	0,03
4091	Intron 9	C→G		12	3	0,23	0,53	0,04	0,04
4097	Intron 9	C→T		10	1	0,62	0,82	0,1	0,13



Die Auswertung der detektierten Polymorphismen ergab keinen wesentlichen Unterschied zwischen Kontrollen und Patientinnen mit PCOS. Die Allelfrequenzen in beiden Gruppen für die jeweiligen Polymorphismen zeigt die folgende Tabelle (Tab.3.5). In Tabelle A.1. im Anhang ist die genaue Verteilung der Allele in Bezug auf die 22 verschiedenen Polymorphismen für jede einzelne Patientin enthalten.

**Tab. 3.5: Polymorphismen des *CYP21A2*-Gens und ihre Allelfrequenz in unserem Patientenkollektiv (Kontroll-bzw. PCOS-Gruppe)**

Nr.	Position	Intron/ Exon	Basen- austausch	Bedeutung	Quelle	Allelfrequenz Kontroll- gruppe	Allelelfrequenz PCO-Gruppe
1	1706	Exon 1	CTG-Ins.	+ L10	3	0,63	0,51
2	1793	Exon 1	T → C	silent mutation	3	0,1	0,13
3	1813	Exon 1	A → C	silent mutation	3	0,22	0,2
4	2074	Intron 2	T → C		3	0,13	0,18
5	2097	Intron 2	C → A		3	0,57	0,39
6	2132	Intron 2	T → C		3	0,76	0,7
7	2242	Intron2	G-Ins.			0,72	0,49
8	2272	Intron 2	G → A			0,02	0,01
9	2279	Intron2	C → G/A			A: 0,11 G: 0,04	A: 0,13 G: 0
10	2307	Intron2	C → G			0	0,01
11	2331	Intron2	C → A			0,59	0,53
12	2361	Exon 3	A → G	Lys→Arg	2, 3	0,63	0,49
13	2538	Intron 3	C → T		3	0,48	0,26
14	3098/ 99	Intron 6	AC→GT		3	0,07	0,12
15	3235	Intron 6	C → T			0,07	0,09
16	3264	Exon 7	C → G	silent mutation	3	0,13	0,12
17	3323	Exon 7	G → C	Ser→Thr	2	0,07	0,09
18	3467	Intron 7	G → C			0,02	0
19	3925	Exon 9	C → T	silent mutation	3	0,07	0,18
20	4049	Intron 9	C → G			0,93	0,9
21	4369	Exon 10	A → G	silent mutation	3	0,63	0,59
22	4377	Exon 10	A → G	Asn→Ser	3	0,72	0,59

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse der klinischen und biochemischen Untersuchungen

#### 4.1.1 Ziel der Untersuchungen

Bei unseren Patientinnen wurden der ACTH- und der LHRH-Test zur Beantwortung verschiedener Fragestellungen durchgeführt.

Zum einen sollten sie zur allgemeinen Einschätzung der hormonellen Situation der Patientin beitragen. Dabei hofften wir, durch die Ermittlung der verschiedenen Hormone und Mediatoren Hinweise auf Schlüsselstellen der Dysregulation bei PCOS-Patientinnen zu gewinnen.

Ein zweites Anliegen bestand darin, ein eventuell vorliegendes biochemisches Profil zu erkennen, das die Tendenz zur Entwicklung eines OHSS ankündigt.

Das im Zusammenhang mit dem ACTH-Test ermittelte Hormonprofil diene der genauen Darstellung des Phänotyps unserer Patientinnen in Hinblick auf die Funktion der 21-Hydroxylase. Üblicherweise wird dafür die Bestimmung des  $17\alpha$ -OHP im Vergleich zu Cortisol vor und nach Stimulation durch ACTH genutzt. Nach den Erfahrungen von Fiet et al. treten jedoch für das  $17\alpha$ -OHP in dem zu erwartenden Wertebereich falsch negative Werte bei heterozygoten Mutationsträgern und falsch positive Werte bei homozygoten Wildtypträgern in 20 bis 50% der Fälle auf (61). Das bestätigt eine 1999 veröffentlichte slowenische Studie mit hyperandrogenämischen Frauen, bei denen die Ergebnisse des ACTH-Tests mit denen der molekulargenetischen Untersuchung und der HLA-Typisierung verglichen wurden. Dabei konnten nur bei 25% der Frauen mit auffälligen  $17\alpha$ -OHP-Werten Veränderungen im *CYP21* festgestellt werden, die anderen 75% waren Wildtypträger. 10% der Patientinnen mit unauffälligem ACTH-Test wurden dagegen als Carrier von Mutationen identifiziert. Diesen Ergebnissen zufolge ist die Ermittlung des  $17\alpha$ -OHP im Rahmen des ACTH-Tests weder ausreichend spezifisch, noch ausreichend sensitiv für die Vorhersage einer bestehenden 21-Hydroxylase-Störung (67).

Bei Vorliegen eines 21-Hydroxylase- Mangels wird 21-DOF in relativ grossen Mengen aus  $17\alpha$ - OHP gebildet. Im gesunden Organismus spielt dieser Mechanismus eine untergeordnete Rolle, ein Mangel an 21- Hydroxylase provoziert jedoch zwangsläufig diesen Stoffwechselweg. Während  $17\alpha$ -OHP zu einem wesentlichen Anteil in den Gonaden synthetisiert wird, wird 21-DOF vorwiegend in der NNR gebildet. Somit ergibt sich für das 21-DOF eine relative Unabhängigkeit von Alter und Zyklusphase der Frau.

Die oben beschriebene Überlappung der Werte von Mutations- und Wildtypträgern sollte bei der Bestimmung des 21-DOF nicht auftreten. Deshalb haben wir uns für die zusätzliche Bestimmung dieses sehr aufwendigen und empfindlichen Markers für einen 21-Hydroxylase-Mangel entschieden (56).

Eine exakte Differenzierung zwischen adrener oder ovarieller Herkunft der Hyperandrogenämie bei PCOS ist schwierig. Im physiologischen Zustand wird beispielsweise Androstendion zu etwa gleichen Teilen in Nebennierenrinde und Ovar gebildet,  $17\alpha$ -OHP und Testosteron sind überwiegend ovariellen Ursprungs, ein bestimmter Anteil des zirkulierenden Hormons stammt dennoch aus der Nebenniere. Dabei unterliegt die ovarielle Sekretion der Regulation durch LH, die adrenale Sekretion der Regulation durch ACTH. ACTH wirkt direkt stimulierend auf die adrenale Synthese, durch LHRH-Gabe kommt es zur hypophysären LH-Freisetzung, die ihrerseits die ovarielle  $17\alpha$ -OHP-Synthese fördert. Genaue Rückschlüsse auf die Quelle der eventuell überschüssigen Antwort auf eine Stimulation sind deshalb bei gleichzeitiger Durchführung beider Tests schwer möglich. Allerdings ermittelten Ibanez et al. den Zeitpunkt der maximalen  $17\alpha$ -OHP-Antwort auf LHRH bei 24 h post stimulationem. Der Zeitpunkt der maximalen adrenalen Antwort nach ACTH-Gabe liegt bei 1-2 h nach Stimulation (68). Dementsprechend gehen wir davon aus, dass es sich bei unserem Testverfahren mit Ermittlung der Werte 60 min nach Stimulation vorwiegend um eine Wiedergabe der ACTH-vermittelten adrenalen Reaktion handelt.

Eine wiederholte Messung der Steroidparameter zur Evaluierung der LHRH-Antwort nach 24 h war aus organisatorischen Gründen nicht möglich, wäre aber ein interessanter Ansatz für nachfolgende Untersuchungen.

#### 4.1.2 Unterschiede im Hormonprofil zwischen PCOS-Patientinnen und Kontrollen

Die **LH**-Basalwerte waren ebenso wie die Serumwerte nach Stimulation durch LHRH bei den PCOS-Patientinnen bei gleichzeitig deutlich niedrigeren FSH-Werten im Vergleich zur Kontrollgruppe nur leicht erhöht. Der Anstieg des LH-Spiegels nach der Stimulation ( $LH_{30}/LH_0$ ) war in beiden Gruppen analog.

Die häufig zitierte überschießende LH-Antwort auf Stimulation bei PCOS-Patientinnen konnten wir nicht nachweisen. Sie ist nach einer Untersuchung von Steck et al. als wenig sensitiv einzuschätzen, da nur etwa 40% der untersuchten PCOS-Patientinnen eine solche Hyperreaktivität zeigten (69). In unserem Patientenkollektiv war eine überschießende LH-Antwort sogar nur in 7,7 % der Fälle nachweisbar ( $LH_{30}/LH_0 > 5$ ).

Die **Quotienten** aus LH und FSH waren sowohl bei den Basalwerten ( $LH_0/FSH_0$ ) als auch den stimulierten Werten ( $LH_{30}/FSH_{30}$ ) bei den PCOS-Patientinnen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Allerdings lag der Median des Quotienten aus den Basalwerten mit 1,0 und den stimulierten Werten mit 2,5 nicht so hoch wie erwartet.

Es gilt als gesichert, dass das Gonadotropinniveau bei PCOS gleichermaßen auf eine erhöhte Frequenz wie auch Amplitude der pulsatilen Gonadotropinfreisetzung der Hypophyse zurückzuführen ist. Die Pathogenese dieser Störungen ist jedoch nicht sicher geklärt. Erwogen werden zentrale Funktionsstörungen ebenso wie eine Beteiligung der Insulin like growth-Faktoren oder eine Beeinflussung durch den Body Mass Index. Nach neueren Erkenntnissen gibt es Hinweise darauf, dass eine verstärkte Aktivität des Follistatins, das eine Hemmung der FSH-Freisetzung bewirkt ohne jedoch die LH-Synthese zu beeinträchtigen, an der Pathogenese des PCOS beteiligt sein könnte. Die bei unseren Patientinnen beobachtete Konstellation der LH und FSH-Werte ist am ehesten durch die letztgenannte Theorie zu erklären (70).

Beim Vergleich der Kontroll- mit der PCOS-Gruppe im Hinblick auf die adrenalen Steroide **DHEA** und **DHEAS** war der basale Wert für DHEA nur leicht erhöht. Aufgrund des etwas stärkeren Anstiegs nach ACTH fand sich beim 60 Minuten-Wert eine signifikante Differenz zwischen beiden Gruppen.

Für **freies Testosteron** und **Gesamttestosteron** beobachteten wir in der PCOS-Gruppe signifikant höhere Werte als in der Kontrollgruppe. Diese korrelierten mit den basalen **17 $\alpha$ -OHP**-Werten. Gleichzeitig war eine negative Korrelation mit dem Anstieg des 17 $\alpha$ -OHP nach ACTH-Stimulation nachweisbar, der sich in der Kontrollgruppe nicht zeigte. Das belegt die starke gegenseitige Beeinflussung von ovarieller und adrenaler Hyperandrogenämie bei PCOS, wie sie von Rosenfield beschrieben worden ist (71).

Für **Androstendion** ergaben sich sowohl bei den basalen als auch bei den durch ACTH-Gabe stimulierten Spiegeln signifikant höhere Werte für die PCOS-Patientinnen. Dabei war der Anstieg in beiden Gruppen gleich, so dass es sich um erhöhte basale Spiegel bei normaler (nicht überschießender) ACTH-Antwort handelt.

Ist der Hyperandrogenismus bei PCOS Folge einer ovariellen oder adrenalen Regulationsstörung? Tierexperimentelle Studien lassen vermuten, dass zirkulierende Androgene adrenalen Ursprungs als Vorstufen für die intraovarielle Konversion dienen. Andererseits gibt es Anhalt dafür, dass die Ovarien einen stimulierenden Einfluss auf die adrenale Androgenproduktion ausüben. Am wahrscheinlichsten dürfte es sich also um eine wechselseitige Beeinflussung beider endokriner Organe handeln (72).

Die Tatsache, dass die basalen und stimulierten 17 $\alpha$ -OHP-Werte bei den PCOS-Patientinnen leicht erhöht, die Differenz zwischen beiden Werten jedoch gleich und der Anstieg (Quotient  $17\alpha\text{-OHP}_{60}/17\alpha\text{-OHP}_0$ ) in der PCOS-Gruppe niedriger als in der Kontrollgruppe ist, spricht für eine normale Antwort auf die ACTH-Stimulation bei basal erhöhten Spiegeln nicht-adrenaler Herkunft. Eine andere Erklärung für diese Hormonkonstellation ist die von Fruzetti et al. (73). Danach wirken erhöhte Testosteronserumspiegel inhibitorisch auf die 21-Hydroxylase. Damit wäre auch die bei unseren Patientinnen vorliegende positive Korrelation zwischen Testosteron und basalem 17 $\alpha$ -OHP und die negative Korrelation zum Anstieg des 17 $\alpha$ -OHP erklärbar.

Auch für **SHBG**, das Bindungsprotein für Sexualsteroiden, das für den Transport derselben im Blut und für den Anteil an freiem, biochemisch wirksamem Hormon verantwortlich ist, zeigten sich eindeutige Differenzen zwischen PCOS- und Kontrollgruppe im Sinne niedrigerer Spiegel bei den PCOS-Patientinnen.

Neben seiner Transportfunktion interferiert SHBG mit dem Androgenrezeptor, beeinflusst die Wirkung von Dehydrotestosteron und hemmt die Östrogen induzierte Zellproliferation (74). Aus diesem komplexen Wirkmechanismus wird deutlich, welchen Einfluss der SHBG-Spiegel auf die Hormonspiegel im Blut hat. Umweltfaktoren wie beispielsweise die Ernährung scheinen die Regulation der Synthese zu beeinflussen. Das wird deutlich am Zusammenhang mit BMI, Leptin- und Insulinspiegeln. Insulin hat direkten Einfluss auf die Funktion der Hepatozyten und hemmt auf diese Weise die Synthese und Freisetzung von SHBG (23).

Die Korrelation von SHBG mit BMI, Insulin und Leptin konnten wir auch bei unseren Patientinnen auf signifikantem Niveau nachweisen.

Die PCOS-Patientinnen in unserer Untersuchung wiesen für den **BMI** einen höheren Medianwert auf als die Kontrollpersonen. Da nicht gänzlich auszuschließen ist, dass Unterschiede im Körpergewicht auch die Steroidsynthese beeinflussen, untersuchten wir die Korrelation zwischen dem BMI und den Sexualsteroiden. In unserem Patientenkollektiv wurde nur für DHEAS und freies Testosteron eine Korrelation mit dem BMI nachgewiesen, für alle anderen Steroide jedoch nicht. Unsere Beobachtungen stimmen mit denen von Azziz et al. überein, nach denen der Einfluss des BMI auf die Steroidsynthese relativ unwesentlich ist (75).

#### **4.1.3 Hinweise auf ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines OHSS**

Es zeigte sich eine Tendenz zu erhöhten **LH**-Basalspiegeln ebenso wie Spiegeln nach Stimulation durch LHRH bei den PCOS-Patientinnen mit anamnestischem OHSS. Allerdings war der Anstieg des LH-Spiegels nach der Stimulation ( $LH_{30'}/LH_{0'}$ ) in der Gruppe mit OHSS signifikant niedriger gegenüber der Gruppe mit PCOS. Möglicherweise liegt in der OHSS-Gruppe ein erhöhter basaler LH-Spiegel bei verminderter Reaktivität auf Stimulation durch LHRH vor.

Im Gegensatz zu den PCOS-Patientinnen ohne OHSS, die im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich niedrigere **FSH**-Basalspiegel aufwiesen, ergab sich für die Frauen mit vorausgegangenem OHSS kaum ein Unterschied zur Kontrollgruppe. Das heißt, die FSH-Spiegel der PCOS-Patientinnen mit OHSS waren deutlich weniger beeinträchtigt als bei den restlichen PCOS-Patientinnen.

Die **Quotienten** zwischen LH und FSH waren in beiden Untergruppen gleichermaßen erhöht bei insgesamt höherem Gonadotropinniveau in der OHSS-Gruppe.

Das Gonadotropinniveau erscheint bei unseren Patientinnen mit OHSS tendenziell erhöht. Da in dieser Gruppe auch der Median des Body-Mass-Index höher war als bei den anderen PCOS-Patientinnen, untersuchten wir unsere Daten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen BMI und LH-Sekretion. Zahlreiche Autoren berichten darüber, dass sowohl bei PCOS-Patientinnen als auch bei gesunden Frauen der LH-Spiegel stark durch den BMI beeinflusst wird. So ist bei Patientinnen mit PCOS die LH-Pulsatilitätsfrequenz unabhängig vom BMI erhöht, die Amplitude der LH-Sekretion nimmt dagegen mit zunehmendem BMI ab.

Arroyo et al. beschrieben, dass bei Frauen ohne hormonelle Auffälligkeiten sowohl sehr niedrige (<20) als auch hohe (>27) BMI mit niedrigeren LH-Spiegeln einhergehen (76). Diesen Zusammenhang konnten wir anhand unserer Daten ebensowenig nachvollziehen wie eine enge Korrelation zwischen BMI und LH.

Für die adrenalen Steroide **DHEA** und **DHEAS** zeichnete sich bei den OHSS-Patientinnen ein niedrigerer Wert als bei den PCOS-Patientinnen ohne OHSS ab, der für DHEAS ein signifikantes Niveau erlangte. Der Anstieg des DHEA nach ACTH-Stimulation war in allen Gruppen gleich, so dass man anhand unserer Daten sagen kann, PCOS-Patientinnen mit und ohne OHSS unterscheiden sich möglicherweise hinsichtlich der basalen adrenalen Hormonspiegel, jedoch nicht hinsichtlich der Reaktionsfähigkeit der Nebennierenrinde auf Stimulation.

Im Gegensatz zu Gustafson et al., die bei einer kleinen Gruppe von OHSS-Patientinnen (n= 9) ein erhöhtes **Androstendion** sowie einen erhöhten Quotienten aus Androstendion und DHEA beschrieben haben, was auf eine verstärkte Androgensynthese ovariellen Ursprungs in der OHSS-Gruppe schließen lässt, konnten wir keinen Unterschied zwischen PCOS-Patientinnen mit bzw. ohne OHSS in Bezug auf Androstendion nachweisen. Allerdings wurde bei den von Gustafson untersuchten OHSS-Patientinnen und den Kontrollen ein PCOS weder diagnostiziert noch ausgeschlossen (77). Für  $17\alpha$ -OHP zeigt sich eine Tendenz zu höheren Werten in der OHSS-Gruppe, wobei der Anstieg nach Stimulation in allen Gruppen etwa

gleich war. In Bezug auf das Gesamttestosteron dagegen registrierten wir signifikant niedrigere Werte für die Untergruppe der OHSS-Patientinnen.

#### **4.1.4 Bedeutung der metabolischen Parameter**

In den letzten Jahren gewann die metabolische Dysregulation im Zusammenhang mit PCOS immer mehr an Interesse. Die Erkenntnis über das gehäufte Auftreten von Adipositas, Hyperinsulinämie und hohen Spiegeln anderer metabolischer Marker wie IGF-1 und Leptin sowie der Einfluss dieser Veränderungen auf die Langzeitprognose der Patientinnen begründen dieses Interesse. Der Prozentsatz der adipösen PCOS-Patientinnen reicht von 30 bis 60% (78). Bei mehr als 50% der betroffenen Patientinnen wird eine gesteigerte Insulinsekretion bei gleichzeitig eingeschränkter Glukosetoleranz gefunden (79).

##### **4.1.4.1 Leptin**

Unter den in unserer Studie untersuchten metabolischen Parametern, deren Messwerte teilweise stark korrelieren und die sich in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen, ergaben sich besonders für Leptin interessante Ergebnisse.

**Leptin** ist ein von Adipozyten produziertes Protein, das über die Interaktion mit Rezeptoren im Hypothalamus die Vermittlung des Sättigungsgefühles triggert. Es ist an der Regulation zahlreicher physiologischer Vorgänge wie Thermoregulation, Fettstoffwechsel, Hämatopoese ebenso wie der  $\beta$ -Zell-Funktion und der Ovarfunktion beteiligt (80). Veränderungen der Leptinspiegel beeinflussen die Fertilität (81). Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass mit Leptin behandelte Mäuse höhere Spiegel an LH und FSH aufweisen als die Kontrolltiere. Die Vermittlung zwischen Leptin und den Gonadotropinen scheint über das Neuropeptid Y zu erfolgen, dessen Synthese durch Leptin gehemmt wird und das seinerseits als Inhibitor von GnRH gilt (82). Dagegen entsteht bei bereits perinataler Hyperleptinämie im Tierexperiment eine Resistenz des NPY-Systems gegen Leptin (83). Die synchrone Pulsatilität der Leptin- und LH-Sekretion, wie sie für gesunde Frauen von Licinio et. al. 1998 gezeigt wurde (84), konnte von Sir-Petermann auch für Patientinnen mit PCOS nachgewiesen werden (85). Da die Pulsatilität der Leptinsekretion auch bei Hemmung der Gonadotropin-Achse durch GnRH-



Analoga persistiert, ist es eher wahrscheinlich, dass Leptin regulatorisch auf die GnRH-LH-Sekretion wirkt als umgekehrt (86).

Anhand unserer Daten konnten wir keine signifikante Korrelation zwischen Leptin- und LH- bzw. FSH-Spiegeln nachvollziehen. Allerdings handelt es sich hierbei um eine einmalige Messung der Spiegel, wodurch eine Beurteilung der pulsatilen Veränderungen der genannten Parameter nicht möglich ist.

Zwischen dem Body Mass Index und den Serumleptinspiegeln existiert ein enger Zusammenhang (87). Patientinnen mit einem PCOS leiden häufig unter einer Adipositas. Die Meinungen darüber, ob die Leptinspiegel bei PCOS-Patientinnen per se erhöht sind, oder ob sie ausschließlich Folge des erhöhten BMI sind, sind kontrovers.

Die meisten Autoren fanden keinen Unterschied in der Leptinkonzentration zwischen adipösen PCOS-Patientinnen und gesunden Frauen mit gleichem BMI (88). Andere Autoren postulieren dagegen, dass die Leptinspiegel bei PCOS-Patientinnen höher sind, als man es bei entsprechendem BMI erwarten würde bzw. als bei gesunden Probandinnen mit gematchtem BMI (89).

Unseren eigenen Ergebnissen folgend schließen wir uns der Meinung der erstgenannten Autoren an. Danach unterscheiden sich die Leptinkonzentrationen bei vorgegebenem BMI nicht wesentlich zwischen PCOS und Kontrollgruppe, wobei sie allerdings in der PCOS-Gruppe aufgrund des oft höheren BMI gemittelt höher liegen.

Nach Sinha und Caro zirkuliert bei Frauen mit niedrigem BMI der größte Teil des Leptin in seiner gebundenen Form, wohingegen es bei adipösen Frauen überwiegend in der freien Form vorliegt (90). Aufgrund dieser Tatsache führt der Vergleich der freien Leptinspiegel zu wesentlich gravierenderen Unterschieden zwischen adipösen und normal gewichtigen Patientinnen.

Der genaue Pathomechanismus des Zusammenhangs zwischen dem BMI und den Leptinspiegeln ist noch ungeklärt, verschiedene Autoren vermuten eine Verbindung über die bei PCOS häufig erhöhten Insulinspiegel. So sanken nach Behandlung von PCOS-

Patientinnen mit Diazoxid die Leptinspiegel in gleichem Maße wie die Insulinspiegel (91). In einer von Laughlin 1997 veröffentlichten Untersuchung an 33 PCOS- und 32 Kontrollpatientinnen korrelierte ausschließlich der Mittelwert der über 24h gemessenen Insulinspiegel signifikant mit dem Leptinspiegel (92). Bei unserer Untersuchung handelt es sich um eine einmalige gleichzeitige Bestimmung von Seruminsulin- und Leptinspiegeln. Dennoch konnten wir eine Korrelation zwischen beiden Parametern nachweisen.

Über die Art der Wechselwirkung zwischen Leptin und Insulin bei PCOS gibt es kontroverse Meinungen. Einige Autoren vertreten die Ansicht, dass die Leptinspiegel nicht unabhängig vom BMI mit der Insulinkonzentration konform gehen. Die periphere Insulinresistenz bei Adipositas, die in einer Vielzahl der PCOS-Fälle vorliegt, verstärkt die möglicherweise prävalente Insulinresistenz. Nach Ciaraldi et al. wird die durch Insulin stimulierte Leptinsekretion demnach durch die bei PCOS bestehende Insulinresistenz der Adipozyten limitiert (93). Diese Beobachtungen konnten wir anhand unserer Daten nicht nachvollziehen. Hier bestand für PCOS-Patientinnen ebenso wie für die gesunden Kontrollen eine Korrelation zwischen Leptin- und Insulinspiegeln.

Grinspoon et al. berichteten über die positive Korrelation zwischen Leptin- und IGF-1-Spiegeln (94). Dieser Zusammenhang ließ sich durch die von uns erhobenen Daten nicht bestätigen.

Es gibt Hinweise darauf, dass Leptin direkt die Wirkung von Insulin auf die Hepatozyten beeinflusst (95). Im Zusammenhang damit ist die negative Korrelation zwischen Leptin und SHBG, wie wir sie für unsere Patientinnen nachweisen konnten, interessant.

Eine Assoziation zwischen Testosteron- und Leptinwerten im Serum, wie sie bei männlichen Probanden existiert (96), konnte für weibliche Probanden von uns ebenso wie von den meisten anderen Autoren nicht erfasst werden (97).

Das Ovar exprimiert Leptinrezeptoren (98) und behält möglicherweise seine Sensibilität gegenüber Leptin auch im Falle einer peripheren Leptinresistenz und daraus folgenden Hyperleptinämie. Karlsson et al. fanden Transkripte für Leptinrezeptor-Isoformen in humanen Granulosa- und Thekazellen (99). Darüber hinaus beobachteten sie, dass Leptin die LH-vermittelte Östradiolsekretion hemmt und damit wiederum auf die hypothalamisch-hypophysäre Regulation der Gonadotropine Einfluss nimmt.

Sierra-Honigmann et al. veröffentlichten 1998 Daten über die angiogene Potenz des Leptins (80). Ihre Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen an Corneazellen. Demnach induziert Leptin in Gegenwart von funktionsfähigen Leptinrezeptoren eine von den Endothelzellen der Cornea ausgehende Neovaskularisation. Über diesen Effekt hinsichtlich der Mikrovaskularisation wäre eine Beteiligung von Leptin neben anderen vasoaktiven Substanzen an der Entstehung eines OHSS bei Frauen mit hohen Leptinspiegeln denkbar.

Unserer Meinung nach geht die Leptinsekretion auch bei PCOS-Patientinnen konform mit dem BMI. Leptin korreliert auf hohem Niveau positiv mit Insulin und negativ mit SHBG. Das Ovar scheint auch bei peripherer Resistenz seine Sensibilität gegenüber Leptin zu behalten. Auf ovarieller Ebene könnte Leptin über die Hemmung der Stimulation durch Gonadotropine und nachfolgend verminderter LH-vermittelter E2-Freisetzung wirken. Auf hypophysärem Niveau fördert es die LH- und FSH-Sekretion durch negatives Feed-back über die niedrigen E2-Spiegel und durch Hemmung der hypothalamischen Freisetzung von NPY.

#### **4.1.4.2 Insulin**

In Bezug auf **Insulin** konnten wir anhand unserer Daten keinen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Frauen und Patientinnen mit PCOS feststellen.

Für eine ursächliche Rolle des Insulins in der Pathogenese des PCOS gibt es allerdings zahlreiche Hinweise. Da die Hyperinsulinämie sowohl nach Entfernung beider Ovarien als auch nach antiandrogener Therapie persistiert (19), ist es relativ unwahrscheinlich, dass die erhöhten Insulinspiegel eine Folge der gesteigerten ovariellen Androgenproduktion sind. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Hyperinsulinämie einen ursächlichen Einfluss auf den gestörten Androgenhaushalt nimmt.

Eine Erhöhung der Insulinspiegel führt zum Anstieg von Testosteron im Serum (100). Dass andererseits die Senkung der Insulinspiegel mit einer Normalisierung der Androgenspiegel einhergeht, zeigt eine Studie von Nestler et al. Die Therapie mit Diazoxid führte bei PCOS-Patientinnen zum Abfall der Testosteron- und zum Anstieg der SHBG-Werte während bei gesunden Probanden keine signifikante Veränderung dieser beiden Parameter stattfand (101).

Die Erhöhung der Serum-Androgenkonzentration durch Insulin lässt sich auf verschiedene metabolische Effekte des Insulins zurückführen. So korreliert die Insulinkonzentration umgekehrt mit der Konzentration an SHBG, dem Transportprotein für Testosteron im Blut (23). Dieser Zusammenhang war auch innerhalb der von uns untersuchten Stichprobe nachweisbar. Insulin führt in vitro zur Hyperplasie der Stroma- und Thekazellen des Ovars sowie zur verstärkten Expression von LH-Rezeptoren auf der Thekazelloberfläche, wobei die Ovarien ihre Sensitivität gegenüber Insulin auch bei bestehender peripherer Insulinresistenz behalten (20, 102, 103).

Meirow et al. postulierten, dass das Vorliegen einer Insulinresistenz ein wesentliches Unterscheidungskriterium für Untergruppen innerhalb der PCOS-Population darstellen könnte (104). Danach sollen Patientinnen mit Insulinresistenz weitaus stärker von Adipositas, Hirsutismus, erhöhten Testosteron- und verminderten SHBG-Spiegeln betroffen sein als die Patientinnen, bei denen eine Insulinresistenz ausgeschlossen wurde. Diese wiesen dagegen höhere Androstendionspiegel sowie eine höhere LH/ FSH-Ratio auf. Diese Unterscheidung gelang uns anhand unserer Daten nicht, wobei das Insulinniveau insgesamt relativ niedrig war und die Variation zwischen den einzelnen Patientinnen nicht deutlich erschien.

Obwohl wir keinen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Frauen und denen mit PCOS darstellen konnten, bestand doch eine positive Korrelation zwischen Insulin, Body Mass Index und Leptin sowie eine negative Korrelation mit SHBG. Damit wird auch bei unseren Patientinnen eine Beteiligung von Insulin an der Regulation der metabolischen Veränderungen bei PCOS wahrscheinlich.

#### **4.1.4.3 Insulin-like growth factor 1**

Für den Insulin-like growth factor IGF-1 ergab sich ebenfalls keine signifikante Differenz zwischen PCOS und Kontrollen.

Das System der IGF mit Bindungsproteinen und Rezeptoren ist an der Vermittlung der Wirkung der Gonadotropine innerhalb des Ovars beteiligt. Die Ergebnisse von Nahum et al. und Cara et al. geben Anhalt dafür, dass Veränderungen im Zusammenspiel dieser Faktoren zu einer übersteigerten Androgenproduktion durch das Ovar führen können. In vitro-Studien haben gezeigt, dass IGF-1 in Thekazellen die DNA-Synthese und damit die

Androgenproduktion stimuliert und zusätzlich die Expression der LH-Rezeptoren auf der Thekazelloberfläche fördert (20, 83).

Die mangelnde Nachweisbarkeit einer Differenz der IGF-1-Werte zwischen PCOS-Patientinnen und Kontrollen in unserer Studie ist möglicherweise damit zu erklären, dass ausschließlich die Spiegel an Gesamt-IGF, nicht jedoch die Bindungsproteine IGFBP 1 und 3 ermittelt wurden. Im Einklang mit unseren Ergebnissen beschreiben die meisten Studien normale Werte an zirkulierendem IGF-1 bei PCOS-Frauen. Die trotzdem vorhandene gesteigerte Bioaktivität erklärt sich durch Veränderungen in den Spiegeln der Bindungsproteine. Innerhalb derer ist der Spiegel an IGFBP-3, dem Haupttransportprotein für IGF-I bei PCOS-Patientinnen gegenüber anderen Frauen nicht vermindert. Die Spiegel an IGFBP-1 sind jedoch in der PCOS-Population deutlich niedriger (105). Für die Einschätzung der Wirkung des bioaktiven IGF-1 und den Zusammenhang mit anderen Parametern erscheint es deshalb sinnvoll, die Untersuchung der entsprechenden Bindungsproteine einzuschließen.

#### **4.1.5 Beurteilung der Aussagekraft biochemischer Untersuchungen zur Differenzierung zwischen den Gruppen**

Hinsichtlich der Unterscheidung zwischen PCOS-Patientinnen und Kontrollgruppe zeigten die androgenen Steroide erwartungsgemäß ein im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhtes Niveau. Dabei war eine klare Abgrenzung zwischen adrenalem und ovariellern Ursprung des Hyperandrogenismus nicht möglich. Dies kann als Zeichen für die wechselseitige Beeinflussung der Steroide beider endokriner Organe gewertet werden. Für eine zuverlässige Differenzierung zwischen adrener und ovarieller Herkunft der Hyperandrogenämie wäre die getrennte Durchführung von LHRH- und ACTH-Test unter jeweils optimalen Bedingungen möglicherweise hilfreich.

Die höheren Leptinspiegel in der PCOS-Gruppe scheinen eher im Zusammenhang mit dem ebenfalls erhöhten BMI in der Patientengruppe zu stehen als ein eigenständiger Marker für PCOS zu sein.

Die enge Verbindung der Spiegel von Insulin, Leptin und SHBG untereinander sowie mit dem BMI sind als Hinweis auf den Einfluss der metabolischen Parameter auf die Pathogenese des Syndroms zu werten.

Folgende Parameter gaben Hinweise auf ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines OHSS.

Für die Gesamtheit der PCOS-Patientinnen gilt ein Zusammenhang zwischen Testosteron und den Basalwerten bzw. dem Anstieg des  $17\alpha$ -OHP. Dieser konnte bei den Frauen mit anamnestischem OHSS nicht nachgewiesen werden, er ist hier möglicherweise aufgehoben. Die gefährdeten Patientinnen weisen leicht erhöhte  $17\alpha$ -OHP-Werte auf bei etwa gleichen Androstendionwerten und signifikant niedrigeren Testosteron- und DHEAS-Spiegeln. Zur Unterscheidung zwischen den PCOS-Patientinnen, die im Rahmen der kontrollierten ovariellen Hyperstimulation ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines OHSS tragen, und denen ohne ein solches erhöhtes Risiko, könnte ein Hinweis auf den ovariellen Ursprung der Hyperandrogenämie weiterhelfen.

Bei leicht erhöhten Werten für LH und FSH ist der Quotient aus beiden bei PCOS-Patientinnen mit OHSS in gleichem Maße erhöht wie bei den restlichen PCOS-Patientinnen. Besonders interessant ist die Tendenz zu höheren Leptinspiegeln in der OHSS-Gruppe. Aufgrund der angiogenen Potenz des Leptins (80) wäre eine Beteiligung desselben an den pathophysiologischen Vorgängen, die zur Entstehung eines OHSS führen, denkbar.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Regulationsstörungen finden sich in der Literatur weitere interessante Hinweise auf pathogenetische Zusammenhänge zwischen PCOS und OHSS.

**Renin-Angiotensin.** Die Reninkonzentration ist in kleinen atretischen Follikeln, wie sie beim PCOS vorkommen, höher als in normalgroßen Follikeln (106).

Messungen sowohl des Reningehaltes im Plasma als auch der Proreninkonzentration ergaben erhöhte Werte in der Gruppe der PCOS-Patientinnen. Dabei korrelierten die Proreninwerte sehr deutlich mit den Androgenspiegeln im Blut (107, 108).

**Interleukine,  $TNF\ \alpha$ .** Beim Gehalt an Interleukinen und  $TNF\alpha$  in der Follikelflüssigkeit konnte kein Unterschied zwischen PCOS-Patientinnen und gesunden Probanden nachgewiesen werden (109).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die IL- 6-Produktion der Granulosazellen HCG- bzw. LH-abhängig ist, d. h. dass bei erhöhten LH-Spiegeln auch mit erhöhten IL-6-Spiegeln zu rechnen ist (110).

**VEGF.** Die VEGF-Bildung von Granulosazellen ist in vitro abhängig von HCG (111).

Neueren Untersuchungen zufolge sind die Serumspiegel an VEGF bei PCO- bzw. PCOS-Frauen im Vergleich zu gesunden Probandinnen signifikant erhöht (112). Auch die Blutflussgeschwindigkeit im Stroma polyzystischer Ovarien, die mit Hilfe von Doppleruntersuchungen bestimmt werden kann, zeigte sich in einer Studie erhöht (112). Der Nachweis einer verstärkten Perfusion polyzystischer Ovarien könnte eine mögliche Erklärung für das gehäufte Auftreten eines OHSS bei Patientinnen mit polyzystischen Ovarien liefern

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die LH-Konzentration im Serum, die beim klassischen PCOS typischerweise erhöht ist, sehr gut mit dem VEGF-Spiegel in der Follikelflüssigkeit korreliert (113).

Der Einfluss von IGF-1, das bei einigen PCOS-Patientinnen erhöht ist, auf die VEGF-Produktion, wurde bereits am Beispiel von Retinazellen nachgewiesen (114).

IGF-1 erhöhte konzentrationsabhängig die Expression der VEGF- mRNA.

Anhand kultivierter Colon-Cancer-Zellen wurde gezeigt, dass IGF-1 die VEGF-Spiegel durch Induktion der Transkription des VEGF-Gens reguliert (115).

Die mögliche Rolle der erhöhten Androgenspiegel, eines häufigen Befundes bei PCOS, wurde am Beispiel androgenabhängiger Prostatakarzinome untersucht. Nach Kastration und damit Reduzierung der Androgenspiegel sanken auch die Spiegel an VEGF (116).

Als gesichert gilt, dass der Nachweis eines PCOS mit einem erhöhten Risiko für die Ausbildung eines OHSS im Rahmen der kontrollierten ovariellen Hyperstimulation einhergeht. Die exakte Diagnose eines Polyzystischen Ovar Syndroms vor Beginn der Stimulationstherapie ist deshalb von entscheidender Bedeutung für eine möglichst risikoarme Behandlung.

#### **4.1.6 Beurteilung der Ergebnisse der Blutdruckmessung**

Bei der einmaligen indirekten Messung des Blutdrucks nach Riva und Rocci beobachteten wir folgende Ergebnisse. Wenn man die gesamte Gruppe der PCOS-Patientinnen betrachtet, waren sowohl der diastolische als auch der systolische Druck signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Diese Beobachtungen werden von Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen bestätigt. In einer Arbeit von Holte et al., die ein 24-h-Blutdruckmonitoring bei Frauen mit PCOS und Kontrollpersonen durchführten, wiesen die PCOS-Frauen erhöhte Werte für den systolischen Blutdruck und den mittleren arteriellen Druck auf (25).

Neben den erhöhten Medianwerten für die gesamte PCOS-Gruppe sind für die Prognose der einzelnen Patientin die folgenden Befunde wesentlich bedeutsamer. Die Zahl der Fälle mit Grenzwerthypertonie (RR über 140/90 und bis 160/95 mmHg) lag in der Kontrollgruppe bei 1 (4,5%), in der gesamten PCOS-Gruppe dagegen bei 11 (26,3%). Hinweise auf eine bestehende manifeste Hypertonie (RR > 160/95 mmHg) fanden wir in der Kontrollgruppe nicht, in der gesamten PCOS-Gruppe hingegen bei 4 Patientinnen (3 x bei PCOS und 1x bei PCOS und OHSS), das entspricht 10,5%. Wenn man das relativ junge Alter der Patientinnen in Rechnung stellt und bedenkt, dass 50% der Fälle einer Grenzwerthypertonie in eine manifeste Hypertonie übergehen, sind das schwerwiegende Befunde. Nach den Ergebnissen einer prospektiven Bevölkerungsstudie aus Skandinavien litten 27,8% der PCOS-Frauen im Alter unter 50 Jahren an einer behandlungsbedürftigen Hypertonie im Vergleich zu 3,5% in der gleichaltrigen Kontrollgruppe. Bei den über 50-jährigen waren es 53,3% im Vergleich zu 17,3% (23). Nach einer retrospektiven Auswertung der Daten von schwedischen 40-bis 59-jährigen PCOS-Patientinnen, litten 20 Jahre nach Diagnosestellung 39% an behandlungsbedürftiger Hypertonie im Gegensatz zu 11% in der Vergleichsgruppe ohne PCOS-Anamnese (26).

Wahrscheinlich sind die Ursachen für die signifikant höheren Blutdruckwerte in der Hyperandrogenämie sowie der erhöhten Prävalenz für Adipositas und Insulinresistenz bei PCOS-Patientinnen zu suchen. Bezogen auf die von uns untersuchte Patientengruppe spricht die enge Korrelation sowohl des diastolischen als auch des systolischen Blutdrucks mit freiem Testosteron für einen wesentlichen Einfluss der Androgenspiegel auf den Blutdruck. Der diastolische Druck korrelierte außerdem stark mit Insulin und dem SHBG, was auf eine Beteiligung metabolischer Faktoren hinweist.



Worauf die etwas niedrigeren Blutdruckwerte in der Gruppe der OHSS-Patientinnen beruhen, ist unklar. Möglicherweise sind sie auf die insgesamt niedrigeren Androgenspiegel in der OHSS-Gruppe zurückzuführen, wobei sich gerade im Hinblick auf freies Testosteron die PCOS-Patientinnen mit bzw. ohne OHSS nicht wesentlich unterscheiden.

Die Ermittlung des Drucks erfolgte durch einmalige Messung mittels der indirekten Methode nach Riva und Rocci. Diese ist als Screening-Methode geeignet. Die Subjektivität der Einschätzung durch den Untersucher und die Möglichkeit einer passageren Erhöhung des Blutdrucks müssen bei der endgültigen Bewertung allerdings berücksichtigt werden. Verdächtige Befunde müssen deshalb durch Mehrfachmessungen und eventuelle 24-h-Messung verifiziert werden. Da die Bestimmung des Blutdruckes von stets demselben Untersucher durchgeführt wurde, sind subjektive interindividuelle Schwankungen bei unseren Messungen weitestgehend auszuschliessen.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen**

### **4.2.1 Genetische Untersuchungen im Zusammenhang mit PCOS**

Das PCOS zeigt eine hohe Prävalenz innerhalb der Familien der Betroffenen. Daher ist es wahrscheinlich, dass genetische Faktoren eine wichtige Rolle in seiner Ätiologie spielen.

Die Durchführung von Familienstudien zur Erforschung des PCOS weist allerdings einige besondere Probleme auf. Zum einen manifestiert sich die Erkrankung zumeist im fertilen Alter, daher ist es selten möglich, Probandinnen aus mehr als einer oder höchstens zwei Generationen zu gewinnen. Zum anderen gibt es aufgrund der klinischen und biochemischen Heterogenität des Syndroms keine einheitliche Definition des PCOS und daher auch keine vergleichbaren Patientenkollektive innerhalb der zahlreichen Studien. Außerdem gibt es keinen Konsens in der Auffassung über den männlichen Phänotyp der Erkrankung. Die meisten Autoren sehen in einem extrem androgenen Behaarungsmuster mit verstärkter Körperbehaarung bei vorzeitiger androgenetischer Alopezie eine mögliche Manifestationsform bei Männern.

Die Ergebnisse einer großen Familienstudie ergaben, dass 96% der Töchter betroffener Frauen und 82 % der Töchter von Männern mit androgenetischer Alopezie polyzystisch

veränderte Ovarien besitzen (145). Einer anderen Untersuchung zufolge zeigten 19,7% der männlichen Verwandten ersten Grades von PCO-Patientinnen den oben erwähnten Phänotyp (im Vergleich zu 6,5 % der Verwandten von Kontrollpersonen). 31,4% der weiblichen Verwandten ersten Grades wiesen PCOS-Symptome auf. Die Autoren schlossen daraus auf einen autosomal dominanten Vererbungsmodus (118).

Ein weiterer Hinweis auf den starken Einfluss genetischer Faktoren auf die Manifestation des PCOS liefert die Beobachtung persistierender biochemischer Veränderungen bei Zellen von PCOS-Patientinnen unabhängig von wechselnden Umgebungsbedingungen.

Eine Variante im Genom der kultivierten Zellen sorgt für einen unveränderten Phänotyp der Zelle auch bei veränderten Kulturbedingungen. So konnten Nelson et al. Thekazellstämme züchten, die ursprünglich aus Follikeln von PCOS-Patientinnen bzw. Kontrollpersonen stammten. Trotzdem die Zellen über längere Zeit in einem LH-freien Medium gehalten wurden, sezernierten die PCOS-Zellen deutlich größere Mengen an Progesteron,  $17\alpha$ -OHP und Testosteron nach Stimulation durch Forskolin als die Kontrollzellen. Die Ursache für diesen stabilen biochemischen Phänotyp könnte einerseits in einer stabilen metabolischen Prägung (imprint) in vivo oder andererseits in einer genetischen Veränderung liegen (119).

#### **4.2.1.1 Genetische Modelle**

Wenn man PCOS als eine vererbte Erkrankung ansieht, kommen nach Kahsar-Miller und Azziz drei allgemeine genetische Modelle in Frage. Zum ersten das „single gene Mendelian model“, nach dem die Mehrzahl der Fälle auf einen einzelnen spezifischen genetischen Defekt zurückzuführen sind.

Eine zweite Möglichkeit wäre das „multifactorial model“. Danach sind die PCOS verursachenden Defekte nicht einheitlich, sondern stellen eine Häufung von Störungen dar, die auch isoliert auftreten und einzelne Symptome verursachen können.

Das dritte genetische Modell ist das „variable expression single gene model“, eine modifizierte Variante der beiden bereits erwähnten Modelle. Demnach wäre PCOS eine erbliche Erkrankung mit einem spezifischen autosomal dominanten Gendefekt und einem vom Expressionsgrad abhängigen variablen Phänotyp. Das heißt, das Risiko, ein PCOS zu entwickeln, hängt gleichermaßen vom vererbten Genotyp wie auch von bestimmten die Expressivität beeinflussenden Umweltbedingungen ab (120).

Das heterogene klinische und biochemische Erscheinungsbild des PCOS machen eine einzelne genetische Ursache unserer Meinung nach sehr unwahrscheinlich. Dennoch weist das familiär gehäufte Auftreten der Erkrankung auf die Beteiligung genetischer Faktoren bei der Pathogenese hin. So scheint ein Zusammenspiel den Expressionsgrad beeinflussender Umweltfaktoren wie zum Beispiel der Ernährung, mit einer kleinen Anzahl verursachender Gene, die vor allem den Steroidhormon- bzw. Insulinstoffwechsel betreffen, vorzuliegen.

Wegen des heterogenen klinischen Bildes und des bedeutenden Einflusses der Umweltbedingungen favorisieren wir als Erklärungsmodell eine Kombination aus den beiden letztgenannten Modellen.

Eine vielversprechende Methode bei der Beurteilung genetischer Veränderungen als Krankheitsursachen ist die Untersuchung eineiiger- und zweieiiger Zwillinge. In einer australischen Studie wurden 19 eineiige und 15 zweieiige Zwillingspaare untersucht. Dabei zeigten 5 der eineiigen bzw. 6 der zweieiigen Zwillingspaare keine Übereinstimmung in der morphologischen Struktur der Ovarien. Diese Ergebnisse sprechen nicht gegen die Beteiligung genetischer Faktoren, jedoch gegen das Vorliegen einer einzelnen von anderen Einflüssen unabhängigen spezifischen genetischen Störung als Ursache für PCOS (121).

#### **4.2.1.2 Kandidatgene**

Die nachfolgend erwähnten Studien beschäftigten sich mit der Beteiligung verschiedener Kandidatgene an der Entstehung des PCOS. Unter Berücksichtigung des biochemischen Erscheinungsbildes des Syndroms kommen dafür vor allem Gene in Frage, die für wichtige Enzyme des Androgen- und Steroidhormonmetabolismus und der Insulinsekretion sowie für Faktoren, die Einfluss auf die Gonadotropinsekretion bzw. die Regulation des Körpergewichtes haben, kodieren.

Im Ergebnis mehrerer klinischer und laborchemischer in vitro-Untersuchungen der Steroidproduktion bei hyperandrogenämischen Frauen entstand die Vermutung, dass die Allele der *CYP17 $\alpha$* , die sowohl die Funktion der 17 $\alpha$ -Hydroxylase als auch der 17, 20-Lyase steuert, die zentrale Ursache des ovariellen Hyperandrogenismus bei PCOS ist (122).

Carey et al. untersuchten das *CYP17*-Gen bei PCOS-Patientinnen und fanden einen Defekt im Sinne eines Basenaustausches in der 5'-Promotorregion, die zu einer Verstärkung der

Promotoraktivität führen könnte. Anschließend durchgeführte Kopplungsanalysen konnten das *CYP17* als hauptverantwortliches Gen jedoch ausschließen. Ein Zusammenhang zwischen dem beschriebenen Polymorphismus und biochemischen Auffälligkeiten im Sinne erhöhter Serumtestosteronwerte konnte nicht festgestellt werden (123). In einer nachfolgenden Studie wurde ein weiterer Polymorphismus der Promotorregion entdeckt, dessen Prävalenz sich jedoch nicht zwischen Patienten- und Kontrollgruppe unterschied (124).

Gharani et al. veröffentlichten 1997 Untersuchungen zur Bedeutung der *CYP11 $\alpha$*  (Cholesterol side chain cleavage gene). Die publizierten Daten von 97 PCOS-Patientinnen, 51 Frauen mit polyzystischen Ovarien und 59 Kontrollen, die mit Hilfe von STRP-Markern (short tandem repeat polymorphism) untersucht wurden, zeigen eine Verknüpfung zwischen den Gesamttestosteron-Serumspiegeln und Polymorphismen 528 Bp vor dem 5'-Ende des Gens. Die gleiche Population wurde im Hinblick auf die Rolle des Aromatase-Gens (*CYP19*) untersucht. Die Ergebnisse der Fall-Kontroll-Studie wie auch der Kopplungsanalyse konnten keinen Zusammenhang zwischen Allelen des *CYP19* und dem Vorhandensein von PCOS aufdecken (125).

Zahlreiche Studien haben eine Verbindung zwischen PCOS und der Insulinsekretion bzw. Insulinwirkung aufgedeckt. Das legt die Vermutung nahe, dass Defekte der betreffenden Gene eine Rolle in der Ätiopathogenese des Syndroms spielen.

Verschiedene Untersuchungen am Insulinrezeptor-Gen ergaben keinerlei Missense- oder Nonsense-Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne bzw. im gesamten kodierenden Bereich des Insulin-Rezeptorgenes bei hyperinsulinämischen PCOS-Patientinnen. Es ist daraus zu schließen, dass Mutationen im Insulinrezeptorgen keine bedeutende Rolle für die Entwicklung eines PCOS spielen (126, 127).

Zur Erforschung der Rolle des Insulins bei der Entstehung von PCOS untersuchten Waterworth et al. die Rolle der VNTR-Minisatelliten (variable number tandem repeats), die vor dem 5'-Ende des Insulins auf Chromosom 11p15.5 lokalisiert sind. Variationen in diesem Bereich scheinen direkt an der Regulation der Insulinsekretion beteiligt zu sein (128).

Die repetitiven Tandemsequenzen liegen in zwei verschiedenen Verteilungsmustern vor, das Klasse I-Allel besteht aus durchschnittlich 40 repeats, das Klasse III-Allel aus ca. 157 repeats.

Die Autoren untersuchten drei verschiedene Populationen von PCOS-Patientinnen und ihren weiblichen und männlichen Verwandten auf diese Allele. Sie fanden eine starke Korrelation zwischen dem Vorhandensein der Klasse III-Allele und dem Auftreten von PCOS, insbesondere der anovulatorischen Ausprägung des Syndroms (129).

Obwohl Störungen in der LH-Signal-Transduktion aufgrund der hormonellen Befunde bei PCOS sehr wahrscheinlich sind, konnten keinerlei Veränderungen im LH-Rezeptor-Gen nachgewiesen werden.

Urbanek et al. veröffentlichten 1999 eine umfangreiche Studie an 150 Kernfamilien, in der sie 37 Kandidatgene auf die Kopplung mit PCOS untersuchten. Die Genprodukte der ausgewählten Loci sind entweder direkt an der Steroidhormonsynthese oder an ihrer Regulation beteiligt, haben Einfluss auf die Regulation der Gonadotropinwirkung, der Insulinwirkung oder des Körpergewichts.

Nach den Ergebnissen dieser Untersuchung erschien eine Kopplung mit dem Locus für Follistatin am wahrscheinlichsten. Follistatin, ein ovariell Polypeptid, könnte als Activinbindendes Protein eine wichtige Rolle in der Regulation der ovariellen und hypophysären ebenso wie der Betazell-Funktion spielen. Eine weiterführende Untersuchung des Follistatin- Genlocus durch dieselbe Arbeitsgruppe zeigte bei 85 Mitgliedern von 19 Familien von PCOS- Patientinnen insgesamt 17 Mutationen auf. Die nachfolgende Expressionsanalyse ergab keinen wesentliche Unterschied auf mRNA- Niveau zwischen PCOS- Patientinnen und Kontrollen (130).

Für die anderen Genorte, unter ihnen die oben beschriebenen *CYP17*, *CYP19*, Insulin VNTR und INSR, fand sich mit Ausnahme von *CYP11* im Rahmen dieser Untersuchung kein Hinweis auf Kopplung mit PCOS. Die Hinweise für eine mögliche Kopplung mit *CYP11A* erreichten nach Angleichung des p-Wertes aber keine Signifikanz (131).

#### **4.2.1.3 *CYP21A1* als Kandidatgen**

Der Zusammenhang zwischen dem Funktionsverlust der 21-Hydroxylase und dem klinischen Bild des Adrenogenitalen Syndroms ist seit langem bekannt.

Dabei beruht der Mangel an 21-Hydroxylase auf homozygoten oder compound heterozygoten Veränderungen im *CYP21A2*-Genlocus. Die bekannten Mutationen führen zu einem unterschiedlich starken Funktionsverlust des Enzyms, und damit zu verschiedenen

Aussprägungsgraden des Syndroms. Die Symptome der late onset Form weisen eine starke Ähnlichkeit zu denen eines PCOS auf, nämlich Menstruationsstörungen, Akne, Hirsutismus und Seborrhoe. Bei ca. 80% der AGS-Patientinnen findet man zudem im vaginalsonografischen Bild polyzystisch veränderte Ovarien. Diese starke Überschneidung zwischen den Symptomen eines late-onset AGS und eines PCOS führte zu der Forderung von New et al., dass vor der Diagnosestellung PCOS der Ausschluss eines AGS stehen müsse und veranlasste uns, die funktionellen Auswirkungen heterozygoter Mutationen im *CYP21A2*-Gen zu untersuchen.

Eine 2001 veröffentlichte Untersuchung an 29 Mädchen mit Hyperandrogenismus ergab heterozygote Mutationen des *CYP21A1*-Gens in 28% der Fälle, bei 34 Mädchen mit prämaturer Pubarche waren es 8 (23,5%) (132).

#### **4.2.2 Bedeutung von Pseudogenen**

Pseudogene sind funktionslose Genloci, die mit aktiven Genen desselben Genclusters assoziiert sind. Beide Gene liegen auf dem gleichen Chromosom. Beim Sequenzaustausch zwischen beiden Loci kann die Funktionsfähigkeit des aktiven Gens erheblich beeinträchtigt werden. Ungleiches crossing-over zwischen beiden Genen kann zur vollständigen Deletion des intakten Gens oder zur Bildung eines Hybridgens, das einen Abschnitt des Pseudogens enthält, führen. Darüber hinaus kann das Pseudogen bei einer Genkonversion als Donor wirken und so eine die Funktion beeinträchtigende Sequenz in das aktive Gen eingebaut werden. Das *CYP21*-Gen ist das wichtigste Beispiel für eine solche intrachromosomale Genkonversion. Verschiedene Autoren beschrieben bei Patienten mit 21-Hydroxylase-Defizienz ebenso Mutationen, die durch Genkonversion aus dem Pseudogen entstanden sein können wie auch eine Genkonversion des kompletten B-Gens durch das A-Gen bei betroffenen Patienten. Andere Beispiele für Konversionen zwischen aktiven Genen und ihren Pseudogenen sind der Phenylalaninhydroxylase-Locus, das Glucocerebrosidase-Gen oder die Globin-Gene.

Deletionen und Duplikationen des *CYP21A1*-Gens haben nach den derzeitigen Erkenntnissen keinerlei funktionelle Bedeutung (133). Dennoch lässt sich bei unseren Patientinnen ein deutlicher Unterschied zwischen PCOS-Patientinnen und Kontrollpersonen im Hinblick auf die Häufigkeit dieser Deletion feststellen. Eine heterozygote *CYP21A1*-Gen-Deletion konnten

wir bei 4 Kontrollen nachweisen, das entspricht 17%, in der Gruppe der PCOS-Patientinnen waren es 11, gleichbedeutend mit 28%. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen den Patientinnen mit und ohne Neigung zur Überstimulation. Eine homologe Deletion des A-Gens wurde nur bei einer einzigen Patientin entdeckt. Sie gehört der PCOS-Gruppe an. Einen Einfluss dieser Befunde auf die Werte für  $17\alpha$ -OHP bzw. 21-DOF, die die Funktion des Enzyms 21-Hydroxylase am exaktesten repräsentieren, konnten wir nicht nachweisen.

#### **4.2.3 Allele des *CYP21A2*-Gens**

Genetische Veränderungen, die zu verminderter 21- Hydroxylase Aktivität führen, sind entweder Punktmutationen oder große Läsionen wie Deletionen oder Genkonversionen.

Dabei sind die 30 kb-Deletionen die häufigsten, gefolgt von Konversionen von *CYP21A2* zu *CYP21A1*, die meist die 5'-Region betreffen und seltenen Rearrangements (134).

##### **Deletionen**

Bei der Fusion von *CYP21A1* und *CYP21A2* entstehen Hybridgene zum Teil mit großen Deletionen. Die weniger aktive Promotorregion von *CYP21A1* kann dabei den Promotor von *CYP21A2* ersetzen und dessen Expression verhindern (135).

Bis heute sind zwei große ca. 30 kb umfassende Deletionen beschrieben, die durch unequal crossing over während der Meiose entstanden sind.

Die häufigere Deletionsvariante betrifft die 3'-nahe Region des *CYP21A1*-Gens, das gesamte *C4B*-Gen und die 5'-nahe Hälfte des *CYP21A2*-Gens. Es entsteht ein Hybridgen, mit einer *CYP21A1*-Sequenz am 5'-Ende und einer *CYP21A2*-Sequenz strangabwärts des Fusionspunktes. Es gleicht dem durch Genkonversion entstandenen Gen. Beide sind funktionslos, weil sie die für das Pseudogen typische 8 bp-Deletion enthalten (133). Die Träger dieses Fusionsgens leiden fast ausschließlich unter der schwersten Form, der SW-Form der congenitalen adrenalen Hyperplasie, in seltenen Fällen wurde in Abhängigkeit von der Fusionsstelle das klinische Bild der SV-Form beschrieben.

Die seltenere Deletion umfasst das gesamte *CYP21A2*-Gen und das *C4B*-Gen (133).

## Konversionen

Mit dem Begriff Genkonversion wird eine Interaktion zwischen Genen beschrieben, die nicht reziprok ist, d.h. zu einem ungleichen Austausch von genetischem Material führt. Ein Allel bedingt dabei die Modifikation eines zweiten Allels. Nach Kobayashi (136) erfolgt bei Genkonversionen in Säugetierzellen eine Heteroduplexformation zwischen beiden Allelen und eine Reparatur der Basenfehlpaarungen. Seiner Meinung nach spielt die Genkonversion repetitiver Gene in der Evolution eine große Rolle. Genkonversionen zwischen Genen und ihren gekoppelten homologen Pseudogenen wird als Mechanismus der Mutationsentstehung angesehen.

Das *CYP21* ist das wichtigste Beispiel für intrachromosomale Genkonversion, wobei Sequenzen des Pseudogens in das aktive Gen gelangen und umgekehrt. Die Mehrzahl der bisher bekannten Punktmutationen in *CYP21* sind mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Genkonversion zwischen *CYP21A1* und *CYP21A2* entstanden. Die Basenaustauschstellen sind nicht in einer bestimmten Region des *CYP21* gehäuft, sondern über das gesamte Gen verteilt (133, 137).

## Punktmutationen

Im Folgenden sind alle bekannten Punktmutationen im Hinblick auf ihre Entstehung sowie funktionelle Bedeutung erläutert.

Bis heute sind elf Mutationen bekannt, die aus dem *A1*-Gen stammen und bei Übertragung auf das *A2*-Gen zu einem Funktionsverlust der 21-Hydroxylase führen (64-66, 138-141). Dabei führen die Punktmutationen zu Austausch von Aminosäuren, Bildung von Stop-Codons und damit verbundenem vorzeitigem Kettenabbruch oder zu veränderten Splice-Stellen. Andere Veränderungen in der Sequenz, die durch Konversion aus dem *A1*-Gen entstanden sind, scheinen neutrale, also nicht funktionelle Polymorphismen darzustellen.



In Tab. 4.1 sind die durch Konversion entstehenden defekten Allele im einzelnen aufgeführt.

**Tab. 4.1: Durch Konversion aus *CYP21A1* entstandene Mutationen des *CYP21A2*-Gens und biochemische Manifestation des 21-Hydroxylase-Mangels (SV: simple virilising; SW: salt wasting, NC: non classical), siehe auch Seiten 13 und 14.**

Lokalisation	Mutation	Allel	Biochemischer Effekt	Schweregrad	Quelle
Exon 1 (1766)	C-T	Pro30-Leu	Funktionsverlust von 40% bzw. 75% beim Abbau von $17\alpha$ -OHP bzw. Progesteron	NC	64
Intron 2 (2333)	A/C-G	Splicingdefekt infolge Frameshift	100%iger Funktionsverlust	SW	65
Exon 3 (2385)	8bp-Deletion	Frameshift	100%iger Funktionsverlust	SW	138
Exon 4 (2677)	T-A	Ile172-Asn	98%iger Funktionsverlust	SV	139
Exon 6 (3058)	ATC-AAC/AAG	Ile235-Asn/Lys	100%iger Funktionsverlust	SW	65
Exon 6 (3062)	T-A	Val236-Glu	100%iger Funktionsverlust	SW	65
Exon 6 (3067)	T-A	Met238-Lys	100%iger Funktionsverlust	SW	65
Exon 7 (3361)	G-T	Val281-Leu	Funktionsverlust von 25% bzw. 70% beim Umsatz von $17\alpha$ -OHP bzw. Progesteron	NC	66
Exon 7 (3435)	T-Insertion	Frameshift	100%iger Funktionsverlust	SW	66
Exon 8 (3672)	C-T	Gln318-Stop	100%iger Funktionsverlust	SW	140
Exon 8 (3786)	C-T	Arg356-Trp	100%iger Funktionsverlust (Veränderung der substratbindenden Domäne)	SW	141

Andere für das Pseudogen spezifische Sequenzen, die zu Veränderungen der Basenfolge des *A2*-Gens führen können, jedoch neutrale Polymorphismen darstellen, sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Sie haben keinen Einfluss auf die Enzymfunktion.

**Tab. 4.2: Polymorphismen des *CYP21A2*-Gens, deren Sequenz mit der des Pseudogens übereinstimmt.**

Lokalisation	Mutation	Allel	Quelle
Vor Exon 1 (1675)	C-T		64
Exon 1 (1706)	CTG-Insertion	+28 Leu	64, 65, 142
Exon 1 (1793)	T-C	Leu39-Leu	64
Exon 1 (1813)	A-C	Pro45-Pro	64
Intron 2 (2074)	T-C		64
Exon 5 (2799)	C-A/G	Asp183-Glu	143
Intron 6 (3098/99)	AC-GT		64
Exon 7 (3264)	C-G	Leu248-Leu	64

In Tabelle 4.3 sind pathogene Mutationen im *CYP21A2*-Gen, die nicht mit der Sequenz des Pseudogens in Zusammenhang stehen aufgeführt.

**Tab 4.3: Relevante Mutationen des *CYP21A2*-Gens ohne Zusammenhang zum *CYP21A1*-Gen.**

Lokalisation	Mutation	Allel	Biochem. Effekt	Schwere-grad	Quelle
Exon 7 (3391)	G-A	Gly291-Ser	100%iger Funktionsverlust	SW	144
Intron 7 (3458)	G-C	Splicingdefekt	100%iger Funktionsverlust	SW	65
Exon 8 (3736)	G-C	Arg339-His	30-60%iger Funktionsverlust	NC	145
Exon 9 (3943)	G	Glu380-Asp	100%iger Funktionsverlust	SW	64
Exon 9 (4018)	G-A	Trp406-X	100%iger Funktionsverlust	SW	65
Exon 10 (4256)	C-T	Pro453-Ser	30-60%iger Funktionsverlust	NC	145
Exon 10 (4347)	G-C	Arg483-Pro	100%iger Funktionsverlust	SW	144

Veränderungen in der Sequenz des *CYP21A2*-Gens, die in keiner offensichtlichen Beziehung zum Pseudogen stehen und für die Enzymfunktion unerhebliche Polymorphismen darstellen, sind in Tabelle 4.4 enthalten.

**Tab. 4.4: *CYP21A2*-Polymorphismen, die nicht durch Konversion entstanden sind.**

Lokalisation	Mutation	Defektes Produkt	Quelle
Intron 2 (2098)	C-A		64
Intron 2 (2132)	T-C		64
Exon 3 (2361)	A-G	Lys102-Arg	64, 65, 146
Exon 3 (2371)	C-T	Pro105-Leu	65
Intron 3 (2528)	C-T		64
Intron 3 (2539)	C-T		64
Exon 6 (3052)	T-C	Asp234-Asp	64
Exon 7 (3324)	G-C	Ser268-Thr	65, 146
Exon 9 (3925)	C-T	Ser374-Ser	64
Exon 10 (4369)	A-G	Pro490-Pro	64
Exon 10 (4377)	A-G	Asn493-Ser	64

Die Diagnostik der Veränderungen im *CYP21A2*-Gen ist kompliziert. Die meisten defekten Allele des *A2*-Gens sind durch Konversion von für das *A1*-Gen ganz normalen Sequenzen entstanden. Deshalb ist es notwendig, bei der Diagnose von Mutationen sicherzustellen, dass

diese auch wirklich ganz spezifisch das aktive, also das *CYP21A2*-Gen betreffen. Dies wird kompliziert durch die hohe Homologie beider Gene.

#### **4.2.4 Diskussion der eigenen genetischen Ergebnisse**

##### Deletionen

Das gesamte Gen umfassende Deletionen fanden wir in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv ausschließlich für das *CYP21A1*-Gen. Es zeigte sich ein deutlich häufigeres Auftreten in der Gruppe der PCOS- Patientinnen gegenüber den Kontrollen. Eine heterozygote *CYP21A1*-Gen-Deletion konnten wir bei 11 PCOS- Patientinnen nachweisen, entsprechend 28%. Ein Unterschied zwischen den Patientinnen mit und ohne Neigung zur Überstimulation ließ sich nicht feststellen. In der Kontrollgruppe waren es 4 Patientinnen, gleichbedeutend mit 17%. Die einzige homologe Deletion des *CYP21A1*-Gens fanden wir bei einer Patientin mit PCOS. Einen Einfluss dieser Befunde auf die Funktion der 21-Hydroxylase war nicht nachweisbar.

##### Punktmutationen

Bei unseren Patientinnen fanden wir in insgesamt 11 Fällen heterozygote Mutationen, die bekanntermaßen im homozygoten Zustand ein AGS unterschiedlicher Ausprägung verursachen. Die Frequenz an heterozygoten Mutationen in der PCOS- Gruppe beträgt bei 9 Fällen 23,1%. Demgegenüber stehen nur 2 Trägerinnen heterozygoter Mutationen in der Kontrollgruppe, entsprechend 8,7%. Das stimmt überein mit der angenommenen Heterozygotiefrequenz in der Normalbevölkerung von 5 bis 8% (52).

Im Folgenden sind die in unserem Patientenkollektiv aufgedeckten Mutationen im einzelnen charakterisiert.

##### SplIn2

Diese bei einer Patientin mit PCOS und OHSS gefundene Mutation ist durch die Sequenzänderung von AA/ AC-AG gekennzeichnet. Sie führt zu defektem Splicing in Intron 2 und über eine Verschiebung der Translations-Leseraster zu einem vorzeitigen Kettenabbruch. Bei homozygotem Vorliegen verbleibt eine Restaktivität der 21-Hydroxylase von 0-5% (64, 65, 66).

### V281L

Diese Mutation fanden wir in heterozygoter Form bei einer Patientin mit PCOS und OHSS. Sie führt in homozygoter oder compound heterozygoter Form zu einer Konformationsänderung des Proteins und reduziert die Enzymaktivität um 50 bis 80% je nach Substrat (17 $\alpha$ -OHP bzw. Progesteron) (65, 66).

### Q318X

Das für Glutamin codierende Basentriplett CAG wird in den nonsense Codon TAG umgewandelt. Im homozygoten oder compound heterozygotem Zustand führt dies zum klassischen AGS (64, 65, 66). Wir fanden eine heterozygote Mutation bei einer Kontrolle.

### P30L

Diese Mutation detektierten wir in heterozygoter Form bei insgesamt 7 Patientinnen, davon 3 Patientinnen mit PCOS und OHSS, 3 Patientinnen mit PCOS und 1 Kontrollpatientin. Durch einen Austausch zwischen C und T wird Prolin durch Leucin ersetzt. Prolin ist in vielen mikrosomalen P450- Enzymen enthalten und ist für die Orientierung des Enzyms hinsichtlich des aminoterminalen Endes des transmembranen Abschnittes wichtig. Bei homozygoter Mutation bleiben 60% der Aktivität der 21-Hydroxylase erhalten (64).

### -4A-T

Bei einer PCOS-Patientin detektierten wir den heterozygoten Austausch von A zu T vier Basenpaare vor dem Startcodon von Exon 1. Der Einfluss auf die Funktion der 21-Hydroxylase im Falle einer homozygoten oder compound heterozygoten Mutation ist bisher unbekannt.

Die lückenlose Darstellung der Gensequenz deckte eine Vielzahl weiterer heterozygoter Sequenzabweichungen auf, die nach unserem Kenntnisstand bisher in der Literatur nicht beschrieben worden sind.

Nur wenige von diesen Mutationen hatten Veränderungen im biochemischen Profil zur Folge. Lediglich bei einer Patientin mit PCOS und einer G-Insertion an Position 2365 in Exon 3 fanden wir jenseits der 90. Perzentile liegende Quotienten aus 21-DOF und Cortisol vor und nach Stimulation durch ACTH. Bei zwei weiteren PCOS- Patientinnen, bei denen die Quotienten aus 17 $\alpha$ -OHP und Cortisol über der 90. bzw. 75. Perzentile lagen, fand sich ein Basenaustausch in Intron 8 bzw. 9. Daneben bestand bei beiden Patientinnen jeweils eine

heterozygote bekannt pathogene Mutation, so dass der Einfluss der Sequenzabweichung im Intron auf den pathologischen biochemische Befund eher fraglich ist.

Die Relevanz dieser Mutationen im Sinne auffälliger biochemischer Befunde und der Symptomausprägung sowie die Häufigkeit ihres Auftretens sollte ein Aspekt weiterführender Untersuchungen sein.

#### Polymorphismen

Für die detektierten Polymorphismen ergab sich erwartungsgemäß kein wesentlicher Unterschied zwischen Kontrollen und Patientinnen mit PCOS hinsichtlich der Allelfrequenzen.

#### 4.2.5 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die Frage nach der Genotyp- Phänotyp- Korrelation ist über das wissenschaftliche Interesse hinaus von großer praktischer Bedeutung sowohl für die Therapiekonzeption als auch für die klinische Prognose und Diagnostik.

Den aussagekräftigsten Hinweis auf eine partielle 21-Hydroxylaseinsuffizienz als Folge einer heterozygoten Sequenzänderung im *CYP21A2*- Gen sollte unserer Meinung nach der überschießende Anstieg von  $17\alpha$ -OHP bzw. 21-DOF im Vergleich zu einer verminderten Cortisolantwort auf Stimulation durch ACTH liefern. Einen oberhalb der 90. Perzentile der für die Kontrollgruppe ermittelten Werte liegenden Quotienten aus  $17\alpha$ -OHP bzw. 21-DOF und Cortisol nach ACTH-Stimulation, als Indikator für das Vorliegen einer partiellen 21-Hydroxylase- Defizienz, fanden wir bei 4 Patientinnen mit PCOS (davon 3 mit OHSS). Darüber hinaus zeigten 4 PCOS-Patientinnen pathologisch erhöhte Quotienten aus den Basalwerten von  $17\alpha$ -OHP bzw. 21-DOF und Cortisol. 7 Patientinnen mit PCOS (davon 4 mit OHSS) wiesen erhöhte  $17\alpha$ -OHP bzw. 21-DOF-Basalwerte auf. Auch bei zwei der Kontrollpatientinnen fanden wir laborchemische Hinweise auf einen 21-Hydroxylase-Mangel. 8 der insgesamt 17 Patientinnen mit biochemischen Auffälligkeiten im Sinne einer partiellen 21-Hydroxylase- Insuffizienz sind Trägerinnen heterozygoter Mutationen im *CYP21A2*-Gen.

Von den insgesamt 11 Mutationsträgerinnen fielen also nur 8 durch biochemisch suspekten Befunde auf.

Daraus ergibt sich nicht für jeden Fall eine Übereinstimmung zwischen dem hormonanalytischen Anhalt für eine 21-Hydroxylase-Defizienz und einer Punktmutation im *CYP21A2*-Gen, d.h. zwischen Phänotyp und Genotyp.

Mögliche Gründe für eine mangelnde Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp sind im Folgenden aufgeführt.

Die Genexpression und damit das biochemische Ergebnis wird durch die Art der Mutation in unterschiedlichem Maße modifiziert.

Auch bei gleichem Genotyp wurden Unterschiede in der klinischen Ausprägung bzw. Unstimmigkeiten zwischen hormonellen und genetischen Befunden beobachtet.

Das Auftreten unterschiedlicher Phänotypen bei identischem Genotyp kommt bekanntermassen sowohl bei autosomal dominantem als auch rezessivem Erbgang vor.

Witchel et al. 1998 beobachteten in einer Patientengruppe von n= 83 mit Homozygotie und Compound Heterozygotie für Deletion und SplIn2 eine phänotypische Variabilität, die von asymptomatisch bis zu klassischem AGS mit Salzverlustsyndrom reichte (57).

Eine Untersuchung an 22 Frauen mit Hirsutismus bzw. hyperandrogenämischer Hormonsituation im Hinblick auf eine Übereinstimmung zwischen Phänotyp (Anstieg des  $17\alpha$ -OHP nach ACTH-Stimulation) und Genotyp (Allele des *CYP21A2*-Genlokus) ergab die Beobachtung, dass die Mehrzahl der Patientinnen mit überschießender  $17\alpha$ -OHP-Antwort heterozygote Träger von Defekten im *CYP21*-Locus sind (147). Zu derselben Schlussfolgerung kommen auch Witchel und Lee. Allerdings beobachteten sie, dass 50% der von ihnen untersuchten heterozygoten Träger völlig unauffällige Ergebnisse im ACTH-Test aufwiesen. Sie schließen daraus, dass eine normale  $17\alpha$ -OHP-Antwort im ACTH-Test eine heterozygote Mutation im *CYP21A2*-Gen nicht ausschließt und deshalb die Genotypisierung die mit Abstand verlässlichste diagnostische Methode ist (57). In einer weiteren Studie wurden 38 weibliche Carrier heterozygoter *CYP21*-Mutationen (Mütter von Kindern mit late onset AGS) im Vergleich zu 27 Kontrollpersonen in Hinblick auf die Androgenspiegel untersucht. Die Mutationsträger zeigten höhere basale Testosteronwerte und einen verstärkten Anstieg des  $17\alpha$ -OHP nach ACTH. Aber sowohl bei den basalen Spiegeln von DHEAS und Androstendion wie auch bei den Androstendionwerten nach Stimulation konnten keine



Unterschiede zwischen Trägerinnen und Kontrollen nachgewiesen werden. Die Autoren schließen daraus, dass Heterozygotie im *CYP21*-Gen nicht zwangsläufig mit einem erhöhten Risiko für eine klinisch manifeste Hyperandrogenämie einhergeht (148).

Andererseits kann auch die unvollständige oder fehlerhafte Erfassung des Phänotyps im Hinblick auf die Serumspiegel für 17 $\alpha$ -OHP oder 21-DOF zu scheinbaren Unstimmigkeiten zwischen Genotyp und Phänotyp führen. Die Kompensation nachgewiesener Mutationen über Nebenwege oder das Einwirken äusserer Einflüsse z.B. auf das pränatale mütterliche Milieu tragen darüber hinaus zur unterscheidlichen klinischen Ausprägung der Symptomatik bei.

Aus den Ergebnissen resultiert, dass heterozygote Mutationen im *CYP21A2*-Gen zur Entwicklung eines PCOS führen können, allerdings konnten bei der Mehrzahl der Patientinnen mit PCOS weder Mutationen noch hormonelle Auffälligkeiten hinsichtlich einer 21-Hydroxylase-Defizienz ermittelt werden. Bei den meisten dieser Patientinnen sind die Ursachen der hormonellen Verschiebungen noch ungeklärt.

Dörner und seine Arbeitsgruppe gehen davon aus, dass der Ausgangspunkt für ein PCOS in endogen und exogen bedingten Enzymstörungen in der pränatalen Entwicklungsphase liegt.

Unabhängig von der Prävalenz partieller 21-Hydroxylase-Defizienzen wird als mögliche Ursache für den Anstieg der Prävalenz des PCOS bei nach 1955 in Ostdeutschland geborenen Frauen die Wechselwirkung mit dem in dieser Zeit verstärkt eingesetzten DDT und seinem Metaboliten o,p'-DDD diskutiert. DDT selbst besitzt Östrogenaktivität und aktiviert möglicherweise die 17,20-Lyase. Der Metabolit o,p'-DDD weist einen stark inhibitorischen Effekt auf die 3 $\beta$ -HSD auf, was zu einer partiellen 3 $\beta$ -HSD-Insuffizienz mit PCOS-ähnlicher Symptomatik führen könnte (149).

#### **4.2.6 Methodenkritik**

Die von uns angewandte Methode der automatischen Sequenzierung ist die derzeit genaueste und effektivste Methode zum Nachweis von Mutationen und Polymorphismen. Sie gestattet als einzige Methode auch die Detektion bisher unbekannter Mutationen. Die genanalytische Erkennung von Veränderungen im Fall der 21-Hydroxylase-Defizienz birgt eine prinzipielle Schwierigkeit. Die Mehrzahl der Mutationen und Polymorphismen im aktiven *CYP21A2*-Gen sind durch Mikrokonversionen aus dem *CYP21A1*-Pseudogen entstanden und liegen somit als

Wildtypform des *CYP21A1*-Gens vor. Für den Nachweis dieser Mikrokonversionen in das aktive Gen ist daher die Trennung von *CYP21A1*- und *CYP21A2*-Gen erforderlich. Hierfür stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Eine Möglichkeit zum Nachweis bekannter Mutationen ist die Allel-spezifische PCR, d.h. einer der beiden PCR-Primer bindet ausschließlich an die veränderte Sequenz und das entstehende PCR-Produkt ist somit für diese Mutation spezifisch. Eine weitere Möglichkeit ist die Allel-spezifische Oligonukleotidhybridisierung. Durch Amplifikation mit *CYP21A2*-spezifischen Primern und Dot-Blot-Hybridisierung mit mutationsspezifischen Oligonukleotiden können bekannte Mutationen detektiert werden (150). Helmberg et al. zeigten Mutationen durch unspezifische Amplifikation und anschließende Klonierung der Amplifikate in einem Plasmidvektor. Die Kolonien zeigen nach Hybridisierung mit mutationsspezifischen Oligonukleotiden eine alleltypische Verteilung der Dot Blots (151).

Im Rahmen unserer Untersuchungen war es sinnvoll, zunächst das gesamte Gen mittels dreier *CYP21A2*-spezifischer Primerpaare zu amplifizieren und anschließend mit Hilfe von 15 weiteren Primern zu sequenzieren. Dabei dient der Bereich der 8-Basenpaar-Deletion bei jeweils einem Vorwärts- und einem Rückwärtsprimer als Unterscheidungsmerkmal zwischen beiden Allelen, der dritte spezifische Primer umfasst eine Sequenz, in der sich Pseudogen und aktives Gen in drei Basen voneinander unterscheiden.

#### **4.2.7 Notwendigkeit der genetischen Untersuchung der 21-Hydroxylase**

Die verbreitete Methode der Diagnostik einer partiellen 21-Hydroxylase-Defizienz bei hyperandrogenämischen Patientinnen ist der ACTH-Test mit Bestimmung der  $17\alpha$ -OHP- und Cortisolwerte vor und nach ACTH-Gabe. Dabei treten für das  $17\alpha$ -OHP falsch negative Werte bei heterozygoten Mutationsträgern in ca. 10% und falsch positive Werte bei homozygoten Wildtypträgern in 50% der Fälle auf (56). Demzufolge ist die Ermittlung des  $17\alpha$ -OHP im Rahmen des ACTH-Tests weder ausreichend spezifisch, noch ausreichend sensitiv für die Diagnose einer partiellen 21-Hydroxylase-Defizienz. Bei der Bestimmung des 21-DOF tritt eine solche Überlappung der Werte von Mutations- und Wildtypträgern nicht auf, so dass 21-DOF als einziger ausreichend spezifischer und sensitiver biochemischer Marker gilt. Die Bestimmung dieses sehr empfindlichen Markers ist allerdings äußerst

aufwendig und störanfällig und deshalb nur an sehr wenigen hochspezialisierten Zentren verfügbar.

Die exakte Unterscheidung zwischen hyperandrogenämischen Patientinnen mit nicht-klassischem AGS infolge einer partiellen 21-Hydroxylase-Defizienz und anderen Ursachen ist mittels klinischer und biochemischer Diagnostik selbst unter Zuhilfenahme des 21-DOF nicht in allen Fällen möglich. Ein Screening des Genortes der 21-Hydroxylase *CYP21A2* auch im Hinblick auf heterozygote Mutationsträger ist deshalb von Vorteil.

Mit Hilfe der molekulargenetischen Diagnostik kann die exakte und zweifelsfreie Diagnose gestellt werden. Daraufhin ist die spezifische Behandlung der Hyperandrogenämie unter Berücksichtigung der jeweiligen Ätiologie möglich. Bei Schwangerschaft der betroffenen heterozygoten Carrier kann eine gezielte genetische Beratung und Diagnostik erfolgen.

## 5 Zusammenfassung

### Endokrinologie

Das Ziel der vorbeschriebenen Studie bestand darin, zur Klärung der Pathophysiologie des PCO- Syndroms und des im Rahmen der assistierten Reproduktion bei diesen Patientinnen besonders häufig auftretenden ovariellen Überstimulationssyndroms in Bezug auf die Funktion der 21-Hydroxylase beizutragen.

Forschungen der Arbeitsgruppe um Dörner erbrachten bereits Hinweise auf einen Zusammenhang der Pathogenese eines PCOS mit partiellen 21-Hydroxylase-Störungen (152). In einer Vorarbeit an einer Gruppe aus 21 PCOS- Patientinnen fanden wir bei ca. 19% der Patientinnen eine heterozygote Punktmutation des *CYP21A2*-Gens (im Vergleich zu 5-8% in der Normalbevölkerung), einhergehend mit erhöhten 21-DOF bzw. 17 $\alpha$ -OHP-Werten (1).

Diese Ergebnisse veranlassten uns, weitergehende Untersuchungen an einem genauer charakterisierten Patientenkollektiv unter Einbeziehung einer Subgruppe aus Patientinnen mit OHSS sowie einer Kontrollgruppe vorzunehmen.

Es sollte die typische hormonelle Konstitution der Patientinnen charakterisiert werden, um durch die Ermittlung von Steroiden unterschiedlichen Ursprungs eventuell Hinweise auf die Quelle des Androgenüberschusses bei PCOS-Patientinnen zu gewinnen.

Besonderes Gewicht lag dabei auf der biochemischen Evaluierung der Funktion der 21-Hydroxylase zum exakten Erfassen des Phänotyps.

Durch die lückenlose molekulargenetische Untersuchung des Genortes der 21-Hydroxylase bei allen Patientinnen sollten bekannte und möglicherweise neue Mutationen oder Polymorphismen aufgedeckt werden und damit die exakte Darstellung des Genotyps als Voraussetzung für eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation geliefert werden.

Die Patientinnengruppe wurde um die Subgruppe der Patientinnen mit PCOS, die im Rahmen der ART ein OHSS entwickelt hatten, erweitert. Anhand der Untersuchung dieser Gruppe sollte ein eventuell vorliegendes für die Potenz zur Entwicklung eines OHSS charakteristisches biochemisches Profil innerhalb der Gruppe der PCOS- Patientinnen evaluiert werden.

Eine unter standardisierten Bedingungen charakterisierte Kontrollgruppe diene als Vergleich.

Nach Auswertung aller biochemischen Parameter zeichnete sich ab, dass die androgenen Steroide im Kollektiv der PCOS- Patientinnen ein im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhtes Niveau aufwiesen, ohne dass jedoch eine klare Unterscheidung zwischen adrenalem und ovariellen Ursprung des Hyperandrogenismus getroffen werden konnte. Dies liegt wahrscheinlich an der wechselseitigen Beeinflussung der Steroide beider endokriner Organe untereinander. Möglicherweise könnte eine zuverlässige Differenzierung zwischen adrenaler und ovarieller Herkunft der Hyperandrogenämie wichtige Hinweise geben. Dafür wäre die getrennte Durchführung von LHRH und ACTH-Test unter jeweils optimalen Bedingungen empfehlenswert.

Patientinnen mit PCOS wiesen höhere Leptinwerte auf als die Kontrollpersonen. Das wird von uns eher als Spiegel des ebenfalls erhöhten BMI in der Patientengruppe denn als eigenständiger Marker für PCOS angesehen. Die Beteiligung metabolischer Parameter an der Pathogenese des PCO-Syndroms wird deutlich an der gegenseitigen Beeinflussung der Serumkonzentrationen von Insulin, Leptin und SHBG sowie deren Zusammenhang mit dem BMI.

Das 21-DOF gilt als sensitivster Hinweis auf eine 21-Hydroxylase-Defizienz. Zudem ist es von der ovariellen Hormonproduktion weitgehend unabhängig. Der sehr aufwendige und störanfällige Parameter brachte in unserer Untersuchung jedoch nicht die gewünschte Information hinsichtlich des Hinweises auf eine 21-Hydroxylase-Defizienz. Gründe für die geringe Aussagekraft des 21-DOF in unserer Studie liegen möglicherweise in methodischen Schwierigkeiten. Dabei muss man berücksichtigen, dass für die Bestimmung der 21-DOF-Serumspiegel sehr fragile Antiseren verwendet werden mussten, da kein kommerzieller Kit zur Verfügung steht. Darüber hinaus sind Kreuzreaktionen zwischen Steroidhormonen nicht auszuschließen, was zu fälschlich hohen Messergebnissen führen kann.

Eine partielle Kompensation des Enzymdefektes über Nebenwege, die zu höheren Cortisol- und niedrigeren 21-DOF-Blutspiegeln führen könnte, scheint eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Bei den PCOS- Patientinnen mit erhöhtem Risiko zu Entwicklung eines OHSS konnte die für die Gesamtheit der PCOS- Patientinnen gezeigte Korrelation zwischen Testosteron und den

Basalwerten bzw. dem Anstieg des  $17\alpha$ -OHP nicht nachvollzogen werden, sie scheint hier als Zeichen der Dysregulation aufgehoben.

Die betroffenen Patientinnen weisen tendenziell erhöhte ovarielle Steroide in Form von  $17\alpha$ -OHP bei etwa gleichen Androstendionwerten und signifikant niedrigeren Testosteron- und DHEAS- Spiegeln als Vertretern der adrenalen Steroide auf. Ein Hinweis auf den ovariellen Ursprung der Hyperandrogenämie bei PCOS- Patientinnen z.B. durch erhöhte  $17\alpha$ -OHP-Werte zeigt die gesteigerte Bereitschaft zur OHSS-Entwicklung an.

Besonders interessant ist die Tendenz zu höheren Leptinspiegeln in der OHSS-Gruppe. Aufgrund der in vitro nachgewiesenen angiogenen Potenz des Leptins (80) ist eine Beteiligung desselben an den pathophysiologischen Veränderungen beim OHSS denkbar.

## Genetik

Die Frequenz der *CYP21A2*-Heterozygoten ist mit 23% für die Patientinnen mit PCOS in der vorliegenden Untersuchung höher als in der Normalbevölkerung bzw. in unserer Kontrollgruppe mit 8%. Dabei war zwischen PCOS- Patientinnen mit bzw. ohne OHSS kein wesentlicher Unterschied erkennbar. Die beschriebenen Allele bewirken in der homozygoten oder compound heterozygoten Form ein schweres AGS. Das PCOS kann in diesen Fällen als heterozygote Manifestation bestimmter *CYP21A2*-Allele angesehen werden. Auf diese Weise erklärt sich die familiäre Häufig in einem autosomal dominantem Erbgang.

Deletionen des Pseudogens *CYP21A1* wurden in der PCOS- Gruppe häufiger beobachtet als in der Kontrollgruppe, scheinen jedoch keinen Einfluss auf die Ausprägung eines PCOS zu besitzen.

Für die detektierten Polymorphismen ergab sich erwartungsgemäß kein wesentlicher Unterschied zwischen Kontrollen und Patientinnen mit PCOS hinsichtlich der Allelfrequenzen.

Die Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, dass *CYP21A2*-Mutationen zur Entstehung eines PCOS bei einem Teil der Patientinnen führen können. Der größere Teil der

Erkrankungen wird dadurch jedoch nicht erklärbar und beruht auf hormonellen Verschiebungen, deren Ursprung noch unklar ist.

Weitere gezielte Untersuchungen monogen bedingter familiärer Formen des PCOS als auch das PCOS verursachender Umweltfaktoren erscheinen daher vielversprechend.

### Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Insgesamt 17 Patientinnen zeigten biochemische Auffälligkeiten im Sinne einer partiellen 21-Hydroxylase-Insuffizienz. Nur 8 von ihnen sind Trägerinnen heterozygoter Mutationen des *CYP21A2*-Gens. Andererseits fielen nur 8 von insgesamt 11 Mutationsträgerinnen durch hormonanalytisch suspekten Befunde auf. Demzufolge ergibt sich nicht für jeden Fall eine Übereinstimmung zwischen dem biochemischen Hinweis auf eine partielle 21-Hydroxylase-Insuffizienz und einer Punktmutation im *CYP21A2*-Genlocus bzw. zwischen Phänotyp und Genotyp.

Abhängig von der Art der Mutation wird die Genexpression und damit die klinische und biochemische Symptomausprägung in unterschiedlichem Maße modifiziert. Selbst bei identischem Genotyp wurden Unterschiede in der klinischen und biochemischen Symptomausprägung der 21-Hydroxylase-Insuffizienz beschrieben. Daneben kann die unvollständige oder fehlerhafte Erfassung des Phänotyps zu scheinbaren Abweichungen zwischen Phänotyp und Genotyp führen. Kompensation des Enzymdefektes über Nebenwege ebenso wie der Einfluss variabler äußerer Bedingungen können die Ausprägung der Symptomatik zusätzlich beeinflussen.

**LITERATURVERZEICHNIS**

1. Ghanaati Z et al.: Endocrinological and genetic findings in patients with polycystic ovary syndrome, *Neuroendocrinology Letters*, 1999, 20 299
2. Jacobs HS.: Polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome, *Gyn Endocrin* 1987, 1, 113
3. Dewailly D et al.: Definition, clinical manifestations and prevalence of PCOS, In: *Androgen excess disorders in women*, edited by Azziz et al., Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia, 1997
4. Dunaif et al. In: *Current issues in endocrinology and metabolism, polycystic ovary syndrome*. Blackwell Scientific Publications, Boston, 1992
5. Ovesen PG et al. Polycystic ovary syndrome II. *Endocrinology and metabolism*, *Ugeskr Laeger*, 1998, 160, 265
6. Barnes RB et al. The polycystic ovary syndrome: Pathogenesis and treatment, *Ann Intern Med*, 1989, 110, 386
7. Adams et al. Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone, *Lancet*, 1985, 1375
8. Burger CW et al. Pulsatile luteinizing hormone patterns in the follicular phase of the menstrual cycle, polycystic ovarian disease (PCOD) and non- PCOD secondary amenorrhea, *J Clin Endocrinol Metab*, 1985, 61, 1126
9. Carmina E., Prevalence of adrenal androgen excess in PCOS, In: *Androgen excess disorders in women*, edited by Azziz et al., Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia, 1997
10. Turner E., Investigations of adrenal function in women with oligomenorrhea and hirsutism (clinical PCOS) from the north- east of England using adrenal stimulation test, *Clin Endocrinol*, 1992, 36, 389
11. Polson DW et al., The distribution of oestradiol in plasma in relation to uterine cross-sectional area in women with polycystic or multifollicular ovaries, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1987, 26, 581
12. Lanzone A et al., Insulin secretion in polycystic ovarian disease: effect of ovarian suppression by GnRH agonist, *Hum Reprod*, 1990, 5, 143
13. Carmina E et al, The contribution of oestrogen and growth factors to increased adrenal androgen secretion in polycystic ovary syndrome, *Hum Reprod*, 1999, 14, 307
14. Rouru J et al., Serum leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome, *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 1697
15. Wild RA et al., The influence of body weight on lipoprotein lipids in patients with polycystic ovary syndrome, *Am J Obstet Gynecol*, 1988, 159, 423
16. Barnes RB., The pathogenesis of polycystic ovary syndrome: lessons from ovarian stimulation studies, *J Endocrinol Invest*, 1998, 21, 567
17. Fauser BC., Observations in favor of normal early follicle development and disturbed dominant follicle selection in polycystic ovary syndrome, *Gynecol Endocrinol*, 1994, 8, 75
18. Azziz R., Abnormalities of Adrenocortical Steroidogenesis in PCOS, In: *Androgen excess disorders in women*, edited by Azziz et al., Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia, 1997
19. Nestler JE, Insulin and ovarian androgen excess, In: *Androgen excess disorders in women*, edited by Azziz et al., Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia, 1997
20. Cara JF, Insulin-like growth factors, insulin- like growth factor binding proteins and ovarian androgen production, *Horm Res*, 1994, 42, 49
21. Anttila L et al., Polycystic ovaries in women with gestational diabetes, *Obstet Gynecol*, 1998, 92, 13



22. Nestler JE et al, Decreases in ovarian cytochrom P450c17a activity and serum free testosterone after reduction in insulin secretion in women with polycystic ovary syndrome, *N Engl J Med*, 1996, 335, 617
23. Buyalos RP et al., The influence of luteinizing hormone and insulin on sex steroids and sex-hormon binding globulin in polycystic ovarian syndrome, *Fertil Steril*, 1993, 60, 626
24. Dahlgren et al., Polycystic ovary syndrome and risk for myocardial infarction: evaluated from a risk factor model based on a prospective study of women, *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1992, 71, 599
25. Holte J et al., Elevated ambulatory day-time blood pressure in women with polycystic ovary syndrome: A sign of a pre- hypertensive state?, *Hum Reprod*, 1996, 11, 23
26. Dahlgren et al, Women with polycystic ovary syndrome wedge resected in 1956 to 1965: a long term follow- up focusing on natural history and circulating hormones, *Fertil Steril*, 1992, 57, 505
27. Farhi DC et al, Endometrial adenocarcinoma in women under 25 years of age, *Obstet Gynecol*, 1986, 68, 741
28. Escobedo LG et al, Infertility- associated endometrial cancer risk may be limited to specific subgroups of infertile women, *Obstet Gynecol*, 1991, 77, 124
29. Schildkraut JM et al, Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome, *Obstet Gynecol*, 1996, 88, 554
30. Urman B et al, Pregnancy in infertile PCOD patients. Complications and outcome, *J Reprod Med*, 1997, 42, 501
31. Zalel Y et al, Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome concomitant with spontaneous pregnancy in a woman with polycystic ovary syndrome, *Am J Obstet Gynecol*, 1992, 167, 122
32. Bassil S et al, Ovarian Hyperstimulation Syndrome: A Review, *Assisted Reprod Reviews*, 1995, 5, 90
33. Ludwig M et al, Überblick über das ovarielle Überstimulationssyndrom: ein reproduktionsmedizinisch- iatrogenes Krankheitsbild mit internistischer Konsequenz, *WMW*, 1997, 22, 516
34. Hurwitz A et al, Early unwinding of torsion of an ovarian cyst as an result of hyperstimulation syndrome, *Fertil Steril*, 1983, 40, 393
35. Schenker JG et al, Complications of assisted reproductive techniques, *Fertil Steril*, 1994, 61, 411
36. Winkler J et al, Acute decline in renal function as a consequence of ovarian hyperstimulation syndrome, *Nephron*, 1992, 60, 104
37. Bornstein R et al, Ovarian hyperstimulation syndrome after different treatment schedules, *Int J Fertil*, 1981, 26, 279
38. Balasch J et al, Acute prerenal failure and liver dysfunction in a patient with severe ovarian hyperstimulation syndrome, *Hum Reprod*, 1990, 5, 348
39. Dahl Lyons CA et al, Early and late presentation of the ovarian hyperstimulation syndrome: two distinct entities with different risk factors, *Hum Repro*, 1994, 9, 792
40. Delbaere A et al, Angiotensin II immunoreactivity is elevated in ascites during severe ovarian hyperstimulation syndrome: implications for pathophysiology and clinical management, *Fertil Steril*, 1994, 62, 731
41. WHO, Agents stimulating gonadal function in human, *World Health Organ Tech Rep Ser*, p. 514
42. Risk B et al, Modern management of ovarian hyperstimulation syndrome, *Human Reprod*, 1991, 6, 1082
43. Navot D et al, Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and traetment, *Fertil Steril*, 1992, 58, 249

44. Dale PO et al, In vitro fertilization in infertile women with the polycystic ovary syndrome, *Human Reprod*, 1991, 6, 238
45. Smits J et al, Incidence of severe ovarian hyperstimulation syndrome after GnRH agonist/ HMG superovulation for in- vitro- fertilization, *Hum Reprod*, 1990, 5, 933
46. Navot D et al, Risk factors and prognostic variables in the ovarian hyperstimulation syndrome, *Fertil Steril*, 1987, 48, 57
47. Goldsman MP et al, Increased capillary permeability induced by human follicular fluid: a hypothesis for an ovarian origin of the hyperstimulation syndrome, *Fertil Steril*, 1995, 63, 268
48. Schenker JG, Clinical aspects of the ovarian hyperstimulation syndrome, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1999, 85, 13
49. Mac Dougall MJ et al, In -vitro fertilization and the ovarian hyperstimulation syndrome, *Hum Reprod*, 1992, 7, 597
50. Mac Dougall MJ et al, A controlled study compairing patients with and without polycystic ovaries undergoing in-vitro fertilization, *Hum Reprod*, 1993, 8, 233
51. Prader A, Zachmann M., Das adrenogenitale Syndrom
52. Speiser PW et al, High frequency of nonclassical steroid 21- hydroxylase deficiency, *Am J Hum Genet*, 1985, 37, 650
53. Dewailly D et al, Pathophysiology and clinical manifestations of nonclassic 21-hydroxylase deficiency. In: *Androgen excess disorders in women*, edited by Azziz et al., Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, 1997
54. Dewailly D, Clinical and biological phenotypes in late-onset 21-hydroxylase deficiency, *J Clin Endocrinol Metab*, 1986, 63, 418
55. Azziz R et al, Diagnosis, screening and treatment of nonclassic 21-hydroxylase deficiency. In: *Androgen excess disorders in women*, edited by Azziz et al., Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia, 1997
56. Fiet J et al, The application of a new highly sensitive radioimmunoassay for plasma 21-deoxycortisol to the detection of steroid 21-hydroxylase deficiency, *Ann Clin Biochem*, 1994, 31, 56
57. Witchel SF et al, Identification of heterozygotic carriers of 21- hydroxylase deficiency: sensitivity of ACTH stimulation tests, *Am J Med Genet*, 1998, 76, 337
58. White PC et al, Structure of human steroid 21- hydroxylase genes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83, 5111
59. Higashi Y et al, Complete nucleotid sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosomes: a pseudogene and a genuin gene, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83, 2841
60. White PC et al, Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the forth component of complement in man, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82, 1089
61. Fiet J et al, Comparison of basal and adrenocorticotropin- stimulated plasma 21- deoxycortisol and 17- hydroxyprogesterone values as biological markers of late- onset adrenal hyperplasia, *J Clin Endocrinol Metab*, 1988, 66, 659
62. Miller SA et al, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucl Acids Res*, 1987, 16, 1988
63. White MB et al, Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms, *Genomics*, 1992, 12, 301
64. Tusie-Luna MT et al, A mutation (Pro 30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele, *Mol Endocrinol*, 1991, 5, 685
65. Higashi Y et al, Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase P450

- (C21) deficiency in humans: Possible gene conversion products, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, *85*, 7486
66. Speiser PW et al, Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B\*14 DR1, *N Engl J Med*, 1988, *319*, 19
67. Dolzan V et al, Adrenal 21-hydroxylase gene mutations in Slovenian hyperandrogenic women: evaluation of corticotrophin stimulation and HLA polymorphisms in screening for carrier status, *Eur J Endocrin*, 1999, *141*, 132
68. Ibanez L et al, Ovarian 17- hydroxyprogesterone hyperresponsiveness to gonadotropine releasing hormone (GnRH) agonist challenge in women with polycystic ovary syndrome is not mediated by luteinizing hormone hypersecretion: evidence from GnRH agonist and human chorionic gonadotropine stimulation testing, *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, *81*, 4103
69. Steck T et al, Response of gonadotropins to pituitary stimulation with luteinizing hormone releasing hormone is a more specific than sensitive parameter for the polycystic ovary syndrome, *Gynecol Endocrinol*, 1991, *5*, 235
70. Urbanek M et al, Thirty- seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: Strongest evidence for linkage is with follistatin, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, *96*, 8573
71. Rosenfield RL, Ovarian and adrenal function in polycystic ovary syndrome, *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1999, *28*, 265
72. Gonzales F, Adrenal involvement in Polycystic Ovary Syndrome, *Semin Reprod Endocrinol*, 1997, *15*, 137
73. Frusetti F et al, Ovarian influence on adrenal androgen secretion in women with polycystic ovary syndrome, *Fertil Steril*, 1995, *63*, 734
74. Fortunati N, Sex hormone- binding globulin: not only a transport protein, What news is around the corner?, *J Endocrinol Invest*, 1999, *22*, 223
75. Azziz R et al, Effect of obesity on the response to acute adrenocorticotropin stimulation in eumenorrheic women, *Fertil Steril*, 1991, *56*, 427
76. Arroyo A et al, Inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome: influence of adiposity, *J Clin Endocrin Metab*, 1997, *82*, 3728
77. Gustafson O et al, Androstendione as a predictor of ovarian hyperstimulation syndrome, *Hum Reprod*, 1992, *7*, 918
78. Franks S., Polycystic ovary syndrome: a changing perspective. Review, *Clin Endocrinol*, 1989, *31*, 87
79. Ciampelli M et al, Insulin and polycystic ovary syndrome: a new look at an old subject. Review, *Gynecol Endocrinol*, 1998, *12*, 277
80. Sierra-Honigsmann MR et al, Biological action of leptin as an angiogenic factor, *Science*, 1998, *281*, 1683
81. Chahab F et al, Corrections of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin, *Nat Genet*, 1996, *12*, 318
82. Stephens TW et al, The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product, *Nature*, 1995, *377*, 530
83. Nahum R et al, Metabolic regulation of androgen production by human theca cells in vitro, *Hum Reprod*, 1995, *10*, 75
84. Plagemann A et al, Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats, *J Neuroendocrinol*, 1999, *11*, 541
85. Sir-Petermann T et al, Are circulating leptin and luteinizing hormone synchronized in patients with polycystic ovary syndrome, *Hum Reprod*, 1999, *14*, 1435
86. Palmert MR et al, The impact of reversible gonadal sex steroid suppression on serum leptin

- concentrations in children with central precocious puberty, *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, **83**, 1091
87. Considine RV et al, Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans, *N Engl J Med*, 1996, **334**, 292
88. Caro JF, Leptin is normal in PCOS; an editorial about three negative papers, *J Clin Endocrin Metab*, 1997, **82**, 1685
89. Brzechffa PR et al, Serum immunoreactive leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome, *J Clin Endocrin metab*, 1996, **81**, 4166
90. Sinha MK et al, Clinical aspects of leptin, *Vitam Horm*, 1998, **54**, 1
91. Krassas GE et al, Leptin levels in women with polycystic ovary syndrome before and after treatment with diazoxid, *Eur J Endocrinol*, 1998, **139**, 184
92. Laughlin GA et al, Serum leptin levels in women with polycystic ovary syndrome: the role of insulin resistance/ hyperinsulinemia, *J Clin Endocrin Metab*, 1997, **82**, 1692
93. Ciaraldi TP et al, Cellular insulin resistance in adipocytes from obese polycystic ovary syndrome subjects involves adenosine modulation of insulin sensitivity, *J Clin Endocrin Metab*, 1997, **82**, 1421
94. Grinspoon S et al, Serum leptin levels in women with anorexia nervosa, *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, **81**, 3861
95. Cohen B et al, Modulation of insulin activities by leptin, *Science* 1996, **274**, 1185
96. Behre HM et al, Strong association between serum levels of leptin and testosterone in men, *J Clin Endocrinol Oxf*, 1997, **47**, 237
97. Geisthovel F et al, C-peptide and insulin, but not C19- steroids, support the predictive value of body mass index on leptin in serum of premenopausal women, *Hum Reprod*, 1998, **13**, 547
98. Cioffi JA et al, The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles, *Mol Hum Reprod*, 1997, **3**, 467
99. Karlsson C et al, Expression of functional leptin receptors in the human ovary, *J Clin Endocrin Metab*, 1997, **82**, 4144
100. De Clue TJ et al, Insulin resistance and hyperinsulinemia induce hyperandrogenism in a young type B insulin resistant female, *J Clin Endocrinol Metab*, 1991, **72**, 1308
101. Nestler JE et al, Suppression of serum insulin by diazoxide does not alter serum testosterone or sex hormone binding globulin levels in healthy nonobese women, *Am J Obstet Gynecol*, 1990, **163**, 1243
102. Barbieri RL, Hyperandrogenism, insulin resistance and acanthosis nigricans. 10 years of progress, *J Reprod Med*, 1994, **39**, 327
103. Willis D et al, Modulation by insulin of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa of normal and polycystic ovaries, *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, **81**, 302
104. Meirow D et al, Insulin resistant and non- resistant polycystic ovary syndrome represent two clinical and endocrinological subgroups, *Hum Reprod*, 1995, **10**, 1951
105. Carmina E et al, Altered regulation of insulin like growth factor binding protein-1 in patients with polycystic ovary syndrome, *J Soc Gynecol Investig*, 1995, **2**, 743
106. Cornwalls CM et al, Follicular fluid renin concentration and IVF outcome, *Hum Reprod*, 1990, **5**, 413
107. Morris RS et al, Prorenin is elevated in polycystic ovary syndrome and may reflect hyperandrogenism, *Fertil Steril*, 1995, **64**, 1099
108. Jaatinen TA et al, Serum total renin is elevated in women with polycystic ovary syndrome, *Fertil*

- Steril, 1995, 63, 1000
109. Jasper M et al, Immunoreactive interleukin-1 beta and tumor necrosis factor- alpha in thecal, stromal and granulosa cell cultures from normal and polycystic ovaries, Hum Reprod, 1995, 10, 1352
110. Orvieto R et al, Interleukin-2 production by cultured human granulosa cells, Int J Fertil Womens Med, 1997, 42, 297
111. Neulen J et al, Human Chorionic Gonadotropin – dependent expression of Vascular endothelial growth factor/ Vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome, J Clin Endocrinol Metab, 1995, 80, 1967
112. Agrawal R et al, Serum vascular endothelial growth factor concentrations and Doppler blood flow velocities in in vitro fertilization: relevance to ovarian hyperstimulation syndrome and polycystic ovaries, Fertil Steril, 1998, 70, 651
113. Anasti JN et al, Human follicle fluid vascular endothelial growth factor concentrations are correlated with luteinization in spontaneously developing follicles, Hum Repro, 1998, 13, 1144
114. Punglia RS et al, Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin- like growth factor I, Diabetes, 1997, 46, 1619
115. Akagi Y et al, Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor I, Cancer Res, 1998, 58, 4008
116. Joseph IB et al, Androgenes regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue, Clin Cancer Res, 1997, 3, 2507
117. Hague W et al, Non-mendelian segregation ratios in familial polycystic ovaries. (Abstract), 7th Int Cong Hum Genet Berlin, 1986, 277
118. Lunde O et al, Familial Clustering in the Polycystic Ovarian Syndrome, Gynecol Obstet Invest, 1989, 28, 23
119. Nelson VL et al, Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries, Mol Endocrin, 1999 in press
120. Kahsar-Miller M et al, The Development of the Polycystic Ovary Syndrome: Family History as a risk Factor, TEM, 1998, 9, 55
121. Jahanfar S et al, A twin study of polycystic ovary syndrome, Fertil Steril, 1995, 63, 478
122. Gilling-Smith C et al, Hypersecretion of androstendione by isolated theca cells from polycystic ovaries, J Clin Endocrinol Metab, 1994, 79, 1158
123. Carey AH et al, Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17, Hum Mol Genet, 1994, 3, 1873
124. Tetchatrasak K et al, Frequency of a polymorphism in the regulatory region of the 17alpha-Hydroxylase-17,20-Lyase (CYP17) in hyperandrogenic states, Clin Endocrin, 1997, 46, 131
125. Gharani N et al, Association of the steroid synthesis gene CYP11alpha with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism, Hum Mol Genet, 1997, 6, 397
126. Conway GS et al, The tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is normal in women with hyperinsulinaemia and polycystic ovary syndrome, Hum Reprod, 1994, 9, 1681
127. Talbot JA et al, Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovary syndrome, J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81, 1979
128. Bennett ST et al, Susceptibility to human typ I diabetes at IDDM 2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus, Nat Genet, 1995, 9, 284
129. Waterworth DM et al, Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome, Lancet, 1997, 349, 986
130. Urbanek M et al, Allelic variants of follistatin gene in polycystic ovary syndrome, J Clin Endocrin

- Metab, 2000, 85 (12), 4455
131. Urbanek M et al, Thirty- seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin, Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96, 8573
  132. Witchel SF et al, Candidate gene analysis in premature pubarche and adolescent hyperandrogenism, Fertil Steril, 2001, 75, 724
  133. Morel Y et al, Clinical and molecular Hum genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency, Adv Genet, 1991, 20, 1
  134. Morel Y et al, Molecular genetics of the congenital adrenal hyperplasia. Cellular and molecular biology of the adrenal cortex, 1992; pp 222: 123
  135. Schulze E et al, Allele-dropout using PCR-based diagnosis for the splicing mutation in intron-2 of the CYP21B-gene: successful amplification with a taq/Pwo-polymerase mixture, Endocr-Res, 1998, 24 (3-4), 637
  136. Kobayashi H et al, Evolutionary origine of mutations in the primate cytochrome P45021 gene, Am J Hum Genet, 1992, 50, 766
  137. Miller WL, Gene conversions, deletions and polymorphisms in congenital adrenal hyperplasia, Am J Hum Genet, 1988, 42, 4
  138. Higashi Y et al, Evidence for frequent gene conversion in the steroid 21-hydroxylase P450 (C21)gene: Implications for steroid 21-hydroxylase deficiency, Am J Hum Genet, 1988, 42, 17
  139. Amor M et al, A mutation in the CYP21B gene (Ile-172 to Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency, Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85, 1600
  140. Globberman H et al, A nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency, L Clin Invest, 1988, 82, 139
  141. Chiou SH et al, A missense mutation at Ile172 to Asn or Arg356 to Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency, J Biol Chem, 1990, 265, 3549
  142. Rodrigues NR et al, Molecular characterisation of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia, EMBO J, 1987, 6, 1653
  143. Higashi Y et al, Effects of individual mutations in the P450(C21) pseudogen on the P450 (C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency, J Biochem, 1991, 109, 638
  144. Wedell A et al, Steroid 21-hydroxylase deficiency: Three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations, Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89, 7232
  145. Helmborg A et al, R338H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid deficiency that are not apparent gene conversions, Mol Endocrinol, 1992, 6, 1318
  146. Helmborg A., Twin genes and endocrine disease: CYP21 and CYP11B genes, Acta Endocrinol, 1993, 129, 97
  147. Azziz R et al, Molecular abnormalities of the 21-hydroxylase gene in hyperandrogenic women with an exaggerated 17alpha-hydroxyprogesterone response to short- term adrenal stimulation, Am J Obstet Gynecol, 1995, 172, 914
  148. Knochenhauer ES et al, Carriers of 21-hydroxylase deficiency are not at increased risk for hyperandrogenism, J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82, 479
  149. Dörner G et al, Genetic and environmental effects on sexual brain organization mediated by sex hormones, International Behavioral Development Symposium 2000 in Minot State University, North Dakota, May 2000
  150. Owerbach D et al, Direct analysis of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification, Mol Endocrinol, 1990, 4 (1), 125
  151. Helmborg A et al, Identification of molecular defects causing congenital adrenal hyperplasiaby

- cloning and differential hybridization of polymerase chain reaction- amplified 21-hydroxylase (CYP21)genes, DNA-Cell-Biol, 1992, 11 (5), 359
152. Dörner G, Umwelthormone als Ursache lebenslanger Fehlfunktionen, Humboldt Spektrum, 1996, 4, 12

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich:

- dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe,
- dass weder früher noch gleichzeitig ein zweites Promotionsverfahren durchgeführt wurde,
- dass mir die geltende Promotionsordnung bekannt ist.



**Danksagung**

Herrn Prof. Dr. W. Lichtenegger danke ich für die freundliche Überlassung des Themas meiner Dissertation.

Bei Frau Dr. B. Pfüller möchte ich mich besonders für die äusserst konstruktive und motivierende Betreuung des gesamten Projektes, insbesondere des klinischen Teils bedanken sowie für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Koordination der einzelnen beteiligten Fachabteilungen.

Herrn Prof. W. Rohde und seinen Mitarbeiterinnen vom Institut für Experimentelle Endokrinologie danke ich für die Erstellung der aufwendigen endokrinologischen Daten und die wertvollen theoretischen Anmerkungen, Herrn PD Dr. M. Ventz für die konstruktive und sehr förderliche Beratung hinsichtlich der Durchführung der endokrinologischen Untersuchungen.

Bei Frau Dr. Z. Ghanaati und Herrn Dr. H. Peters möchte ich mich für die Möglichkeit der Kooperation und die stets hilfsbereite und kompetente Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der genetischen Versuche bedanken.

Der Arbeitsgruppe um Herrn Dr. R. Reinhardt vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik danke ich für die äusserst hilfreiche praktische Unterstützung bei der Erstellung und Analyse der Sequenzierdaten.

Mein besonderer Dank gilt der Firma Organon für die großzügige finanzielle Unterstützung des Projektes.

**Lebenslauf**

Susanne Müller

geboren am 07.09.1971 in Leipzig

09.1978-08.1988	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule mit erweitertem Sprachunterricht
09.1988-08.1990	Erweiterte Oberschule
08.1990	Abitur, Leipzig
09.1990-01.1991	Au-Pair in Grossbritannien
02.1991-10.1991	Ausbildung zur Bankkauffrau bei der Bayerischen Vereinsbank in München
10.1991-09.1993	Medizinstudium, vorklinischer Abschnitt an der Ernst-August-Universität, Göttingen
09.1993	Ärztliche Vorprüfung
09.1993-06.1998	Medizinstudium, klinischer Abschnitt am Virchow-Klinikum der Humboldt-Universität, Berlin
03.1995	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.1996-07.1996	Medizinstudium als Erasmus-Studentin an der Universität Linköping (Schweden)
03.1997	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.1997-03.1998	Praktisches Jahr Innere Medizin am West Middlesex University Hospital, London (GB), Gynäkologie und Geburtshilfe an der DRK-Frauenklinik Pulsstrasse, Berlin Chirurgie am Westmead University Hospital, Sydney und am Royal Hobart Hospital, Hobart (Australien)
06.1998	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09.1998- 08.1999	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Reproduktionsmedizin der Frauenklinik der Charité (Campus Mitte)
09.1999- 02.2001	Ärztin i.P. an der Frauenklinik der Charité
seit 03.2001	Assistenzärztin an der Frauenklinik der Charité (Campus Virchow- Klinikum)

## Eigene Publikationen und Kongressbeiträge

Ghanaati Z, Peters H, Ventz M, Pfüller B, **Müller S**, Zend- Ajusch E, Rohde W & Dörner G (1999) Endocrinological and genetic findings in patients with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Neuroendocrinology letters* 20: 299-303.

Ghanaati Z, Rohde W, Ventz M, Pfüller B, **Müller S**, Peters H & Dörner G (2000) Endocrinological and genetic studies in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). 12. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik. *Medizinische Genetik* 11: 191.

Ghanaati Z, Ventz M, Pfüller B, **Müller S**, Gossing G, Gurr S, Rohde W, Peters H & Dörner G (1999) Biochemical and molecular investigation of the steroid 21-hydroxylase (*CYP21*) gene in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). 10<sup>th</sup> European Students Congress. *MO* 09: 169.

Ghanaati Z, Rohde W, Ventz M, Pfüller B, **Müller S**, Peters H & Dörner G (1999) Mutation screening of the steroid 21- hydroxylase (*CYP21*) gene in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). 11. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik. *Medizinische Genetik* 11: 191.

**Müller S**, Ghanaati Z, Rohde W, Peters H & Dörner G (2000) Endocrinological and genetic studies in patients with idiopathic oligospermia. 12. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik. *Medizinische Genetik* 11: 192.

**Müller S**, Pfüller B, Ghanaati Z, Peters H, Reinhardt R, Rohde W & Lichtenegger W (2000) Biochemical and molecular genetic investigations of 21 hydroxylase (21OHase) and *CYP21* gene in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). 16<sup>th</sup> annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology in Bologna, Italy June 25-28 2000. P 209.

**Müller S**, Pfüller B, Plagemann A & Rohde W Leptinspiegel im Serum von Patientinnen mit Polycystischem Ovar Syndrom (PCOS) und Ovariellen Überstimulationssyndrom (OHSS) 53. Kongress der DGKG in München, 13.- 16. Juni 2000 P1.02.27

## Patientenaufklärung

Liebe Patientin,

wir möchten Sie bitten, uns Ihre Einwilligung für die genetische Untersuchung Ihres Blutes zu geben.

Bei der Untersuchung handelt es sich um die Aufklärung eines möglichen Erbdefektes, der eventuell in Zusammenhang mit dem bei Ihnen vorliegenden PCO- Syndrom steht. Diese Untersuchung in Kombination mit den Hormontests soll uns helfen, betroffene Patientinnen schon frühzeitig zu erkennen und vorbeugende Maßnahmen gegen mögliche Folgeerkrankungen zu ergreifen sowie uns Aufschlüsse über den Verlauf der Erkrankung geben.

Für Sie, liebe Patientin, ist die Belastung bei dieser Untersuchung nur eine zusätzliche Blutentnahme, die im Rahmen der Hormonteste durchgeführt wird. Es werden 10 ml EDTA-Blut entnommen, aus Ihren weißen Blutkörperchen wird dann das genetische Material herausgelöst und der weiteren Untersuchung zugeführt. Dabei wird nur ein extrem kleiner Abschnitt Ihres Erbmaterials untersucht, der möglicherweise mit dem PCO- Syndrom in Verbindung steht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden natürlich vertraulich behandelt und unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht.

Ferner machen wir Sie darauf aufmerksam, daß Sie die Untersuchung auch ablehnen können.

Wir würden uns freuen, wenn Sie unsere Arbeit unterstützen würden. Zur Bestätigung Ihrer Bereitschaft müßten Sie die Einverständniserklärung unterzeichnen.

Liebe Patientin,

wir möchten Sie bitten, uns Ihre Einwilligung für die genetische Untersuchung Ihres Blutes zu geben.

An unserer Klinik wird zur Zeit die Untersuchung eines bestimmten Erbdefektes durchgeführt, der möglicherweise in Zusammenhang mit einer Erhöhung der männlichen Hormonspiegel steht. Bei Ihnen liegt keine solche Erhöhung der männlichen Hormone vor. Bei jeder Untersuchung, in der Zusammenhänge zwischen bestimmten Defekten und den daraus folgenden Symptomen dargestellt werden, muß immer auch eine Gruppe gesunder, symptomfreier Patienten untersucht werden. Zu dieser Gruppe würden Sie gehören.

Für Sie, liebe Patientin, ist die Belastung bei dieser Untersuchung nur eine zusätzliche Blutentnahme. Diese wird im Zusammenhang mit den Hormontesten zur Sterilitätsdiagnostik durchgeführt. Es werden 10 ml EDTA- Blut entnommen, aus Ihren weißen Blutkörperchen wird dann das genetische Material herausgelöst und der weiteren Untersuchung zugeführt. Dabei wird nur ein extrem kleiner Abschnitt Ihres Erbmaterials untersucht, der möglicherweise mit der oben beschriebenen Erkrankung in Verbindung steht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden natürlich vertraulich behandelt und unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht.

Ferner machen wir Sie darauf aufmerksam, daß Sie die Untersuchung auch ablehnen können.

Wir würden uns freuen, wenn Sie unsere Arbeit unterstützen würden. Zur Bestätigung Ihrer Bereitschaft müßten Sie die Einverständniserklärung unterzeichnen.

## Einverständniserklärung

Einverständniserklärung der Patientin zur Teilnahme an einer genetischen Untersuchung des CYP 21 B-Gens

Titel der Untersuchung : Polycystisches- Ovar- Syndrom und Überstimulationssyndrom  
bei 21- Hydroxylasedefekt

Hiermit bestätige ich, daß ich mit der Durchführung der Untersuchung einverstanden bin und mir deren Inhalt und Ausführung erklärt worden sind. Ich bin sicher, daß ich die Aufklärung verstanden habe, und bestätige dies mit meiner Unterschrift.

-----  
Datum

-----  
Unterschrift Patientin

-----  
Unterschrift Arzt

## Verwendete Stammlösungen und Chemikalien

### Nährmedien und Lösungspuffer

Alle Nährmedien und Puffer wurden mit Aqua dest. angesetzt und anschließend autoklaviert. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Werte auf 1000ml.

0,8% Agarosegel	8,0g Agarose 1000 ml 1x TAE- Puffer 50 µl Ethidiumbromidlösung
Alkalischer Lösungspuffer	50 mM NaOH 1 mM EDTA
Alkalische SDS- Lösung	0,2 M NaOH 1% SDS
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5M NaOH
Ethidiumbromidlösung	10mg/ml in Aqua dest.
Heringssperma- DNA	10 mg/ml in Aqua dest., durch Ultraschall auf ca. 500 bp zerkleinert
Hybridisierungslösung I	5x Denhardts 5x SSC 0,5% SDS 7% Dextransulfat 100 µg/ml Heringssperma- DNA
Hybridisierungslösung II	7% SDS 1 mM EDTA- Dinatriumsalz 1% BSA 0,5 M Na <sub>3</sub> P <sub>0</sub> <sub>4</sub> - Lösung ad 1000ml auf pH 7,2 eingestellt
Hybridisierungswaschlösung I	2x SSC / 1mg/ml SDS
II	1x SSC / 1mg/ml SDS
III	0,2x SSC / 1mg/ml SDS
IV	0,1x SSC / 1mg/ml SDS
Lysepuffer	10 mM Tris- HCl 400 mM NaCl 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,0 (autoklaviert)
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris 3 M NaCl mit HCl auf pH 7,0 eingestellt

6% Polyacrylamidgel	42g Harnstoff 10 ml 10x TBE- Puffer 20 ml 30% Acrylamid ad 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M tri- Na- Citrat mit HCl auf pH 7,0 eingestellt
5x TBE- Lösung	0,5 M Tris 0,5 M Borsäure 10 mM EDTA- Dinatriumsalz
50x TAE- Lösung	2 M Tris 50 mM EDTA- Dinatriumsalz mit Eisessig auf pH 7,5 bis 8,0 eingestellt
10x TE- Lösung	10 mM EDTA- Dinatriumsalz 0,1 M Tris- Lösung ad 1000 ml, pH 7,6



## Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
30% Acrylamid	Roth
Agarose Ultra Pure	Gibco
APS	Merck
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform reinst	Merck
dNTP's	Promega
EDTA H <sub>2</sub> O	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol (abs.)	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Boehringer, MH
Harnstoff	Merck
Haftsilan	Merck
KCl	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Perkin Elmer
Mineralöl	Sigma
Natriumcarbonat	Merck
Aqua ad inj.	Braun
Roti- Phenol	Roth
Roti- Phenol- Chloroform	Roth
SDS	Serva
TEMED	Serva
Tris- Base	Merck

## Geräte und Zubehör

Gerät	Hersteller
Biodyne A Transfer Membran	Pall Europe Ltd.
Brutschrank	Heraeus
Cronex Röntgenkasten	Du Pont
Eagle Eye II	Stratagene
Elektrische Waage	Sartorius
Elektrophoresekammer	Hybaid
Eppendorfpipetten	Eppendorf
Filmentwicklergerät	AGFA Curix 60
Filmkassette (20x80 cm)	REGO
Gel- Blotting- Papier (GB 002)	Schleich & Schuell
GelBond PAG Film	Biozym
Geltrockner (SGD 2000)	Savant
Glasplatten SA 60	Life Technologies
Heizblock Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf
Hybridisierofen	Bachofer
Hybridisierflaschen	Bachofer
Magnetrührer	Ikamay RET/ Heidolph
Mikrowellengerät	Mulinex
pH- Meter	Schott
Polaroid MP 4 Land Camera	Polaroid
Polaroid 667 Professional Sofortbildfilme	Polaroid
Röntgenfilm	Scientific Imaging
Schüttler	Gerhard
Sequenzierungs- Gelelektrophorese- System	Gibco BRL
Stromversorgungsgerät	Consort, Mains, RFT
Spektralphotometer	Pharmacia Biotech
Sorvall RT 6000 Kühlzentrifuge	Du Pont
Thermocycler	Perkin Elmer
Tischzentrifuge	IEC Mikro Max
Kühlzentrifuge	Jouan GR 142
UV- Lampe (366 nm)	UV- Produkte
UV- Transluminator (305 nm)	Stratagene
UV- visible recording Spectrophotometer	Shimadzu
Wasserbadkammer	GFL

**Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AGS	Adrenogenitales Syndrom
ART	Technik der Assistierte Reproduktion
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BMI	Body Mass Index
CAH	Congenitale Adrenale Hyperplasie
CYP	Cytochrom P
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
c-DNA	codierende DNA
ds-DNA	Doppelstrang-DNA (double strand DNA)
ss-DNA	Einzelstrang-DNA (single strand DNA)
21-DOF	21-Deoxycortisol
E2	Estradiol
F	Cortisol
FSH	Follikel Stimulierendes Hormon
HCG	Human Choriongonadotropin
Hk	Hämatokrit
HLA	Human Lymphocyte Antigene
3 $\beta$ HSD	3 $\beta$ Hydroxysteroiddehydrogenase
IGF	Insulin like growth factor
IGFBP	Insulin like growth factor binding protein
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon
MHC	Major Histocompatibility Complex
NPY	Neuropeptid Y
17 $\alpha$ OHase	17 $\alpha$ -Hydroxylase
17 $\alpha$ OHP	17 $\alpha$ Hydroxyprogesteron
21OHase	21-Hydroxylase

OHSS	Ovarielles Überstimulationssyndrom
PCO	Polyzystische Ovarien
PCOS	Polyzystisches Ovar-Syndrom
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
SHBG	Sexualhormon bindendes Protein
STRP	short tandem repeat polymorphism
SV	simple virilising (Form des AGS)
SW	salt wasting (Form des AGS)
RIA	Radio Immuno Assay
RR	Blutdruck gemessen nach Riva Rocci
Tab.	Tabelle
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$ , Cachektin
VNTR	variable number tandem repeats
VEGF	vascular endothelial growth factor

# Quelldaten

Patientennummer	Gruppe (1: Kontrollen; 2:PCOS; 3: PCOS und OHSS)	OHSS	Alter	Grösse in m	Gewicht in kg	BMI	Zyklusstörung (1:Amenorrhoe; 2:Oligomenorrhoe; 3:regelmässiger Zyklus)	Hirsutismus (0:nein; 1: ja)	Akne ((0:nein; 1: ja)	systolischer Blutdruck in mmHg	diastolischer Blutdruck in mmHg
1	1	0	38	1,72	65	22	3	0	0	130	90
2	1	0	31	1,69	55	19	3	0	0	120	80
3	1	0	25	1,68	72	26	3	0	0	115	75
4	1	0	33	1,71	65	22	3	0	0	110	65
5	1	0	28	1,72	55	19	3	0	0	135	80
6	1	0	30	1,70	53	18	3	0	0	110	85
7	1	0	33	1,62	69	26	3	0	0	120	80
8	1	0	40	1,66	72	26	3	0	0	105	70
10	1	0	42	1,58	61	24	3	0	0	110	75
11	3	1	34	1,60	84	33	3	2	0	130	95
12	3	1	24	1,65	68	25	2	1	0	135	95
13	3	1	26	1,75	90	30	1	2	1	125	90
14	3	1	32	1,67	50	18	2	0	1	120	80
15	3	1	25				2	0	1	110	80
16	3	1	34	1,50	40	18	2	0	0	120	75
17	3	1	34	1,84	89	26	1	0	1	140	100
18	2	0	21	1,66	54	20	2	1	1	110	70
19	2	0	26	1,58	72	29	1	0	0	120	95
20	2	0	30	1,76	76	25	2	1	0	130	95
21	2	0	33	1,73	50	17	2	2	0	130	90
22	2	0	26	1,67	55	20	2	0	1	135	85
23	2	0	35	1,74	63	21	2	0	0	130	95
24	2	0	30	1,59	50	20	2	1	0	145	90
25	2	0	31	1,52	52	23	1	0	0	125	100
26	2	0	24				1	2	0	140	90
27	2	0	28	1,66	57	21	1	1	0	130	100
28	2	0	34	1,71	100	34	2	0	0	145	105
29	2	0	29	1,84	120	35	1	2	1	125	95
30	2	0	37	1,67	100	36	2	0	1	130	95
31	2	0	29	1,70	80	28	2	1	0	125	85
32	2	0	33	1,70	82	28	1	1	0	135	95
33	2	0	31	1,67	67	24	2	0	0	130	80
34	2	0	27	1,64	66	25	2	2	0	125	85
35	3	1	32	1,63	58	22	2	1	0		
37	3	1	32				2	0	0		
38	1	0	28	1,60	70	27	3	0	0	115	75
39	1	0	29	1,68	75	27	2	0	0	120	75
40	1	0	32	1,60	50	20	3	0	0	110	70
41	2	0	28	1,60	46	18	2	0	0	110	80
42	2	0	26	1,64	70	26	1	1	0	125	95
43	3	1	28	1,61	89	34	1	1	0	125	85
45	1	0	26	1,75	60	20	3	0	0	120	85
46	3	1	29	1,65	73	27	2	2	1	110	70
47	3	1	32	1,63	64	24	3	2	0	110	80
48	1	0	29	1,55	59	25	3	0	0	110	75
49	1	0	31	1,75	60	20	3	0	0	130	95
50	1	0	29	1,59	63	25	3	3	0	120	90
51	2	0	33	1,75	85	28	2	1	1	130	85
52	1	0	25	1,63	60	23	3	2	1	120	70
53	1	0	31	1,53	51	22	2	0	0	110	75
54	1	0	26	1,51	40	18	3	0	0	120	80
55	2	0	29	1,72	100	34	3	1	1	120	80
57	1	0	28	1,70	58	20	3	0	1	130	90
58	3	1	29	1,64	75	28	2	1	1	110	60
59	3	1	29	1,65	57	21	1	2	1	130	75
60	1	0	33	1,72	71	24	3	0	0	110	70
61	2	0	28	1,78	56	18	1	2	1	120	85
62	3	1	28	1,60	70	27	3	2	1	130	95
63	1	0	26	1,67	53	19	3	0	1	110	70
64	3	1	34	1,68	58	21	3	2	0	130	90
65	2	0	27	1,80	105	32	2	0	0	120	90
69	3	1	29	1,70	90	31	2	1	0	130	85

Patientennummer	polyzystische Ovarien (0-nein; 1-ja)	rechtes Ovar quer	rechtes Ovar längs	linkes Ovar quer	linkes Ovar längs	Estradiol basal in pmol/l	Progesteron basal in nmol/l	Prolactin basal in µg/l	T3 in nmol/l	TSH in nmol/l
1	0	33	23	32	26	144	2,8	12,8	12,0	0,02
2	0	39	30	28	18	170	2,8	9,1	4,9	1,50
3	0	31	27	35	30	155	2,5	5,9	4,0	1,30
4	0	33	22	20	17	127	3,3	4,5	5,2	1,40
5	0	40	17	31	16	105	5,1	7,1	4,7	1,20
6	0	18	26	18	29	193	2,7	5,7		
7	0	10	16	23	19	78	0,5	8,5	2,2	0,33
8	0	24	21	25	22	196	0,3	6,4	4,5	0,78
10	0	20	19	20	30	133		8,7	4,4	0,51
11	1	30	25	26	23	170	3,0	4,8	2,4	1,40
12	1	29	22	39	20	77	1,5	5,9	4,9	2,80
13	1	47	23	20	45	1280	5,9	6,4	2,6	0,50
14	1	40	46	32	36	155	2,7	10,1	5,1	1,30
15	1	44	23	42	25	132	4,3	4,7		
16	1			47	27	124	1,1	13,2	2,4	0,66
17	1					104	1,5	10,1	5,2	0,70
18	1	30	19	29	15	127	1,9	11,2	4,7	0,82
19	1	28	34	33	25	135	1,4	6,6	3,7	1,40
20	1	29	20	28	16	101	3,3	4,1	4,4	1,80
21	1	28	21	50	18	159	1,7	10,4	3,9	1,40
22	1	22	27	27	18	96	1,9	25,7	3,8	3,70
23	1	30	20	37	19	102	1,8	8,0	5,5	0,90
24	1	29	14	32	21	196	1,1	8,5	3,7	0,37
25	1	33	35	30	25	80	4,1	10,6	19,7	
26	1	37	27	29	18	165	6,1	6,6	5,7	1,30
27	1	36	24	16	28	151	2,0	11,3	5,6	1,30
28	1	31	28	40	29	96	3,2	7,6	6,1	2,00
29	1	46	33	41	26	145	3,5	5,8	5,4	1,60
30	1	43	27	35	22	123	2,7	10,7	3,9	0,79
31	1	34	27	30	19	81	4,6	7,9	4,7	1,40
32	1									
33	1	34	24	26	20	850	1,8	5,3		
34	1	45	24	48	24	120	1,9	4,1	5,2	7,00
35	1	38	21	33	22	230	2,8	5,9	5,4	0,50
37	1					99	3,5	10,5		
38	0	30	20	29	21	200	1,8	6,5	3,8	0,94
39	0	30	18	38	22	100	2,2	4,9	3,9	1,70
40	0	17	27	30	20	263	3,1	19,3		
41	1	44	22	36	21	177	1,8	13,9	4,8	2,00
42	1	15	12	20	15	92	4,0	47,2	5,8	1,00
43	1	42	21	34	19	112	2,0	6,9	5,0	0,50
45	0	31	23	23	36	499	4,6	7,0	4,8	1,90
46	1	63	63	49	49	291	3,0	3,6	4,7	0,80
47	1	34	23	29	36	137	2,1	3,6	4,8	1,40
48	0	13	23	30	28	158	4,4	24,6	4,2	1,08
49	0	22	15	23	14	257		8,4	5,2	0,98
50	0	25	14	30	26	282	7,1	11,1	4,1	4,20
51	1	38	16	17	31	154	3,8	10,2	5,6	0,54
52	0	23	18	32	25	151	5,3	10,0	5,1	1,60
53	0	42	24	36	24	213	6,3	8,5	5,4	0,38
54	0					250	37,5	6,1		
55	1					88	0,8	9,5		
57	0					103	4,9	10,7	5,0	1,60
58	1	20	41	21	36	100	5,4	5,1	5,2	2,80
59	1					104	2,2	15,4	6,0	2,20
60	0	36	27	32	20	128	4,0	5,7	4,4	0,29
61	1	34	23	24	35	206	4,5	8,2	3,8	0,55
62	1	25	21	23	18	80	3,5	6,6	4,7	1,00
63	0	47	26	34	28	114		7,3	4,8	1,40
64	1	29	28	32	39	226	2,8	4,2	3,9	1,00
65	1					123	11,4	12,4	4,7	0,82
69	1	35	26	32	23	172	4,8	6,4	5,9	1,10

Patientennummer	SHBG in nmol/l	Gesamttestosteron in nmol/l	freies Testosteron in pmol/l	17a-OH-Progesteron basal in nmol/l	17a-OH-Progesteron p.stim. in nmol/l	Quotient 17a-OHP p.stim. / 17a-OHP basal	Differenz 17a-OHP p.stim. - 17a-OHP basal	21-DOF basal in nmol/l	21-DOF p.stim. in nmol/l	Cortisol basal in nmol/l	Cortisol p.stim. in nmol/l
1	56,1	0,86	6,0	1,8	7,6	4,22	5,8	0,86	1,30	350	722
2	56,1	1,93	8,6	2,0	5,1	2,55	3,1	1,48	2,08	232	915
3	42,3	3,67	4,8	1,7	7,7	4,53	6,0	1,08	1,73	173	325
4	49,0	1,97	4,7	2,2	4,5	2,05	2,3	0,20	0,77	256	647
5	46,4	1,23	5,5	1,6	8,9	5,56	7,3	0,19	0,72	270	712
6	46,4	1,55	4,1	1,5	5,9	3,93	4,4	0,17	1,01	378	1113
7	36,8	0,60	2,0	1,3	4,8	3,69	3,5	0,30	0,35	301	749
8	34,0	0,61	0,8	1,1	1,7	1,55	0,6	0,43	0,17	122	316
10	43,2	1,46	8,1	1,1	3,2	2,91	2,1	0,17	0,50	178	390
11	23,1	3,36	13,9	2,9	12,1	4,17	9,2	0,28	0,88	295	1079
12	25,8	1,55	6,2	0,6	7,4	12,33	6,8	0,10	0,61	261	1401
13	34,4	2,97	14,0	2,6	10,3	3,96	7,7	0,16	0,74	266	784
14	73,1	1,50	3,8	1,7	7,8	4,59	6,1	0,13	0,76	598	1192
15		2,20	4,5	1,0	7,2	7,20	6,2	0,05	0,59	95	444
16		1,55	3,9	0,5	4,0	8,00	3,5	0,06	0,56	310	836
17	47,8	0,47	7,3	1,3	8,0	6,15	6,7	0,15	0,69	148	204
18	51,7	3,54	5,2	2,2	7,0	3,18	4,8	1,02	0,57	280	588
19	35,6	2,95	11,8	2,0	6,4	3,20	4,4	0,58	0,88	113	515
20	42,2	3,07	8,7	2,7	4,7	1,74	2,0	1,35	0,43	379	717
21		2,13	6,0	2,4	7,5	3,13	5,1	0,16	1,22	446	672
22	38,9	1,11	7,1	2,7	6,8	2,52	4,1	0,19	0,30	388	868
23	40,0	1,71	11,6	0,8	2,4	3,08	1,6	0,07	0,51	437	821
24		1,85	1,7	1,4	6,8	4,86	5,4	0,03	0,61	276	864
25	6,3	1,65	8,9	1,2	5,0	4,17	3,8	0,07	0,14	458	1097
26	43,0	3,18	12,0	4,2	8,4	2,00	4,2	0,10	0,22	200	822
27		3,06	7,5	2,7	8,4	3,11	5,7	0,26	0,97	896	1411
28								0,09	0,61		
29	8,0	3,04		0,7	2,3	3,29	1,6	0,08	0,30	228	809
30	21,3	1,56	4,7	2,0	9,1	4,55	7,1	0,16	0,42	146	758
31	17,2	1,46	11,5	2,4	9,8	4,08	7,4	0,12	0,51	186	393
32		2,86	11,7					0,17	0,86		
33	24,5	5,21	10,8	5,5	9,1	1,65	3,6	1,36	1,13	244	1075
34	23,8	1,54	7,9	3,5	8,8	2,51	5,3	0,12	0,82	464	1167
35	40,6	1,63	7,8	2,4	6,5	2,71	4,1	0,13	1,33	175	685
37	22,1	0,43	4,4	1,2	4,2	3,50	3,0	0,74	1,11	568	1007
38	42,2	1,00	5,1	1,1	3,9	3,55	2,8	1,07	1,48	430	727
39	39,5	2,87	4,1	1,9	9,4	4,95	7,5	0,89	1,60	119	323
40	56,4	2,64	4,5	2,8	6,1	2,18	3,3			175	765
41	69,6	4,00	9,5	2,8	4,8	1,71	2,0	1,19	0,72	404	755
42	25,5	2,04	4,7	1,1	4,4	4,00	3,3	1,37	1,85	223	727
43	36,2	1,95	10,6	2,0	4,8	2,40	2,8	0,19	0,54	240	157
45	33,7	0,88	8,6	0,9	4,5	5,00	3,6	0,32	0,59	233	667
46	50,1	2,30	9,5	9,6	9,6	1,00	0,0	0,25	3,54	263	772
47	24,3	0,74	6,2	1,3	6,4	4,92	5,1	0,19	0,68	170	625
48	54,3	1,28	6,8	1,1	5,5	5,00	4,4	0,06	0,95	200	566
49	54,6	0,97	8,9	1,8	6,4	3,56	4,6	0,12	1,19	328	972
50	62,0	1,00	5,7	1,2	7,2	6,00	6,0	0,08	0,89	421	1459
51	14,9	1,10	11,9	2,2	5,4	2,45	3,2	0,09	0,71	409	920
52	36,0	0,65	7,9	1,9	4,0	2,11	2,1	0,09	0,36	386	942
53	27,7	1,10	7,3	1,6	4,3	2,69	2,7	0,15	1,36	183	563
54	40,2	0,48	3,9	1,0	5,9	5,90	4,9	0,06	0,38	285	950
55	25,3	0,44	3,4	0,8	6,9	8,63	6,1	0,06	0,35	285	932
57	27,5	0,76	5,6	2,7	10,4	3,85	7,7	0,10	0,61	317	793
58	25,5	0,59	6,8	2,4	10,0	4,17	7,6	0,08	0,58	263	883
59	19,2	0,78	6,7	3,9	10,8	2,77	6,9	0,20	0,51	503	942
60	67,1	1,04	4,2	1,8	7,0	3,89	5,2	0,10	0,56	240	967
61		1,41	6,9			2,62		0,33	2,79	690	1394
62	14,4	1,09	8,2	3,4	8,1	2,38	4,7	0,28	0,78	438	818
63	47,9	0,93	4,1	4,6	10,7	2,33	6,1	0,10	0,62	273	817
64	60,6	0,55	8,4	3,5	12,1	3,46	8,6	0,15	1,27	252	784
65	38,9	0,95	7,9	2,0	6,4	3,20	4,4	0,21	0,30	380	993
69	53,6	1,33	11,4	4,0	7,4	1,85	3,4	0,16	0,74	534	1423

Patientennummer	Quotient Cortisol p.stim. / Cortisol basal	Quotient 17a-OHP basal / Cortisol basal	Quotient 17a-OHP p.stim. / Cortisol p.stim.	Quotient 21-DOF basal x 100 / Cortisol basal	Quotient 21-DOF p.stim. x 100 / Cortisol p.stim.	Quotient 17a-OHP basal / Progesteron	Androstendion basal in nmol/l	Androstendion p.stim. in nmol/l	Differenz Androstendion p.stim. - Androstendion basal	Quotient Androstendion p.stim. / Androstendion basal
1	2,06	0,51	1,05	0,25	0,18	0,64	10,2	11,6	1,4	1,14
2	3,94	0,86	0,56	0,64	0,23	0,71	5,6	9,4	3,8	1,68
3	1,88	0,98	2,37	0,62	0,53	0,68	5,7	11,6	5,9	2,04
4	2,53	0,86	0,70	0,08	0,12	0,67	7,9	6,7	-1,2	0,85
5	2,64	0,59	1,25	0,07	0,10	0,31	4,3	8,6	4,3	2,00
6	2,94	0,40	0,53	0,04	0,09	0,56	3,9	6,3	2,4	1,62
7	2,49	0,43	0,64	0,10	0,05	2,60	3,5	5,1	1,6	1,46
8	2,59	0,90	0,54	0,35	0,05	3,67	1,2	1,6	0,4	1,33
10	2,19	0,62	0,82	0,10	0,13		4,8	6,8	2,0	1,42
11	3,66	0,98	1,12	0,09	0,08	0,97	9,0	16,1	7,1	1,79
12	5,37	0,23	0,53	0,04	0,04	0,40	3,5	9,0	5,5	2,57
13	2,95	0,98	1,31	0,06	0,09	0,44	15,7	26,5	10,8	1,69
14	1,99	0,28	0,65	0,02	0,06	0,63	7,9	12,5	4,6	1,58
15	4,67	1,05	1,62	0,05	0,13	0,23	5,8	12,4	6,6	2,14
16	2,70	0,16	0,48	0,02	0,07	0,45	4,3	6,1	1,8	1,42
17	1,38	0,88	3,92	0,10	0,34	0,87	3,6	7,7	4,1	2,14
18	2,10	0,79	1,19	0,36	0,10	1,16	8,2	8,8	0,6	1,07
19	4,56	1,77	1,24	0,51	0,17	1,43	6,8	9,0	2,2	1,32
20	1,89	0,71	0,66	0,36	0,06	0,82	12,3	12,5	0,2	1,02
21	1,51	0,54	1,12	0,04	0,18	1,41	11,3	12,1	0,8	1,07
22	2,24	0,70	0,78	0,05	0,03	1,42	9,9	12,8	2,9	1,29
23	1,88	0,18	0,29	0,02	0,06	0,43	10,2	14,2	4,0	1,39
24	3,13	0,51	0,79	0,01	0,07	1,27	2,6	5,3	2,7	2,04
25	2,40	0,26	0,46	0,02	0,01	0,29	7,0	8,5	1,5	1,21
26	4,11	2,10	1,02	0,05	0,03	0,69	14,6	18,5	3,9	1,27
27	1,57	0,30	0,60	0,03	0,07	1,35	13,0	16,7	3,7	1,28
28										
29	3,55	0,31	0,28	0,04	0,04	0,20	10,2	19,2	9,0	1,88
30	5,19	1,37	1,20	0,11	0,06	0,74	4,5	8,6	4,1	1,91
31	2,11	1,29	2,49	0,06	0,13	0,52	12,4	23,3	10,9	1,88
32				0,06	0,16					
33	4,41	2,25	0,85	0,56	0,11	3,06	15,7	16,0	0,3	1,02
34	2,52	0,75	0,75	0,03	0,07	1,84	7,0	13,0	6,0	1,86
35	3,91	1,37	0,95	0,07	0,19	0,86	10,8	12,4	1,6	1,15
37	1,77	0,21	0,42	0,13	0,11	0,34	5,4	8,1	2,7	1,50
38	1,69	0,26	0,54	0,25	0,20	0,61	3,6	5,0	1,4	1,39
39	2,71	1,60	2,91	0,75	0,50	0,86	5,0	8,6	3,6	1,72
40	4,37	1,60	0,80			0,90	6,5	7,6	1,1	1,17
41	1,87	0,69	0,64	0,29	0,10	1,56	8,6	10,6	2,0	1,23
42	3,26	0,49	0,61	0,61	0,25	0,28	4,2	9,3	5,1	2,21
43	0,65	0,83	3,06	0,08	0,34	1,00	10,1	10,0	-0,1	0,99
45	2,86	0,39	0,67	0,14	0,09	0,20	9,7	15,9	6,2	1,64
46	2,94	3,65	1,24	0,10	0,46	3,20	11,7	18,1	6,4	1,55
47	3,68	0,76	1,02	0,11	0,11	0,62	5,0	8,8	3,8	1,76
48	2,83	0,55	0,97	0,03	0,17	0,25	8,6	11,4	2,8	1,33
49	2,96	0,55	0,66	0,04	0,12		12,0	16,1	4,1	1,34
50	3,47	0,29	0,49	0,02	0,06	0,17	5,2	10,7	5,5	2,06
51	2,25	0,54	0,59	0,02	0,08	0,58	12,3	11,8	-0,5	0,96
52	2,44	0,49	0,42	0,02	0,04	0,36	6,6	7,2	0,6	1,09
53	3,08	0,87	0,76	0,08	0,24	0,25	10,3	12,3	2,0	1,19
54	3,33	0,35	0,62	0,02	0,04	0,03	3,8	6,6	2,8	1,74
55	3,27	0,28	0,74	0,02	0,04	1,00	1,4	12,4	11,0	8,86
57	2,50	0,85	1,31	0,03	0,08	0,55	5,9	10,2	4,3	1,73
58	3,36	0,91	1,13	0,03	0,07	0,44	9,6	14,0	4,4	1,46
59	1,87	0,78	1,15	0,04	0,05	1,77	11,1	14,5	3,4	1,31
60	4,03	0,75	0,72	0,04	0,06	0,45	9,7	11,7	2,0	1,21
61	2,02			0,05	0,20	1,33	11,8	12,8	1,0	1,08
62	1,87	0,78	0,99	0,06	0,10	0,97	8,4	12,6	4,2	1,50
63	2,99	1,68	1,31	0,04	0,08		4,7	7,6	2,9	1,62
64	3,11	1,39	1,54	0,06	0,16	1,25	15,7	22,0	6,3	1,40
65	2,61	0,53	0,64	0,06	0,03	0,18	10,5	19,4	8,9	1,85
69	2,66	0,75	0,52	0,03	0,05	0,83	14,8	19,3	4,5	1,30



Patientennummer	DHEA basal in nmol/l	DHEA p.stim. in nmol/l	Differenz DHEA p.stim. - DHEA basal	Quotient DHEA p.stim. / DHEA basal	DHEAS in µmol/l	Quotient DHEA basal / Androstendion basal	Quotient DHEA p.stim. / Androstendion p.stim.	Quotient DHEAS basal / Androstendion basal	Quotient Gesamttestosteron basal / Androstendion basal
1	24,4	37,8	13,4	1,55	6,56	2,39	3,26	0,64	0,08
2	19,5	44,4	24,9	2,28	5,30	3,48	4,72	0,95	0,34
3	26,9	43,0	16,1	1,60	7,08	4,72	3,71	1,24	0,64
4	28,8	42,3	13,5	1,47	7,56	3,65	6,31	0,96	0,25
5	33,6	63,1	29,5	1,88	9,24	7,81	7,34	2,15	0,29
6	17,9	48,8	30,9	2,73	6,45	4,59	7,75	1,65	0,40
7	6,8	8,9	2,1	1,31	1,83	1,94	1,75	0,52	0,17
8	4,3	1,6	-2,7	0,37	0,52	3,58	1,00	0,43	0,51
10	17,2	42,9	25,7	2,49	6,42	3,58	6,31	1,34	0,30
11	20,1	46,7	26,6	2,32	7,55	2,23	2,90	0,84	0,37
12	9,9	49,4	39,5	4,99	3,90	2,83	5,49	1,11	0,44
13	59,1	98,7	39,6	1,67	13,30	3,76	3,72	0,85	0,19
14	16,4	39,5	23,1	2,41	8,24	2,08	3,16	1,04	0,19
15	32,8	79,4	46,6	2,42	7,70	5,66	6,40	1,33	0,38
16	9,7	19,4	9,7	2,00	2,87	2,26	3,18	0,67	0,36
17	12,0	44,2	32,2	3,68	3,47	3,33	5,74	0,96	0,13
18	15,8	30,6	14,8	1,94	3,66	1,93	3,48	0,45	0,43
19	17,2	59,4	42,2	3,45	7,85	2,53	6,60	1,15	0,43
20	40,2	42,9	2,7	1,07	4,05	3,27	3,43	0,33	0,25
21	15,4	22,0	6,6	1,43	2,32	1,36	1,82	0,21	0,19
22	35,9	88,6	52,7	2,47	10,60	3,63	6,92	1,07	0,11
23	21,1	47,6	26,5	2,26	7,74	2,07	3,35	0,76	0,17
24	6,3	14,8	8,5	2,35	2,01	2,42	2,79	0,77	0,71
25	33,2	49,9	16,7	1,50	11,90	4,74	5,87	1,70	0,24
26	41,1	70,7	29,6	1,72	18,60	2,82	3,82	1,27	0,22
27	27,3	52,8	25,5	1,93	4,74	2,10	3,16	0,36	0,24
28									
29	38,5	74,6	36,1	1,94	10,80	3,77	3,89	1,06	0,30
30	18,1	37,2	19,1	2,06	7,32	4,02	4,33	1,63	0,35
31	31,0	110,4	79,4	3,56	15,50	2,50	4,74	1,25	0,12
32	54,6	80,5	25,9		8,45				
33	110,8	124,0	13,2	1,12	10,60	7,06	7,75	0,68	0,33
34	22,1	46,7	24,6	2,11	6,32	3,16	3,59	0,90	0,22
35	53,7	67,0	13,3	1,25	4,16	4,97	5,40	0,39	0,15
37	16,4	25,7	9,3	1,57	4,04	3,04	3,17	0,75	0,08
38	11,3	21,7	10,4	1,92	3,95	3,14	4,34	1,10	0,28
39	22,2	86,7	64,5	3,91	8,34	4,44	10,08	1,67	0,57
40	19,4	30,5	11,1	1,57	5,70	2,98	4,01	0,88	0,41
41	30,1	50,8	20,7	1,69	6,08	3,50	4,79	0,71	0,47
42	20,3	61,0	40,7	3,00	8,34	4,83	6,56	1,99	0,49
43	22,1	40,7	18,6	1,84	7,11	2,19	4,07	0,70	0,19
45	22,0	69,0	47,0	3,14	1,55	2,27	4,34	1,60	0,09
46	17,4	43,9	26,5	2,52	7,45	1,49	2,43	0,64	0,20
47	14,9	37,3	22,4	2,50	3,88	2,98	4,24	0,78	0,15
48	11,7	35,2	23,5	3,01	6,38	1,36	3,09	0,74	0,15
49	26,4	40,4	14,0	1,53	7,41	2,20	2,51	0,62	0,08
50	18,0	33,1	15,1	1,84	2,63	3,46	3,09	0,51	0,19
51	17,9	25,8	7,9	1,44	4,00	1,46	2,19	0,33	0,09
52	42,6	38,2	-4,4	0,90	5,37	6,45	5,31	0,81	0,10
53	21,1	18,2	-2,9	0,86	4,73	2,05	1,48	0,46	0,11
54	7,3	13,0	5,7	1,78	1,63	1,92	1,97	0,43	0,13
55	8,9	62,9	54,0	7,07	5,19	6,36	5,07	3,71	0,31
57	15,2	46,2	31,0	3,04	2,81	2,58	4,53	0,48	0,13
58	19,7	43,8	24,1	2,22	2,73	2,05	3,13	0,28	0,06
59	16,2	36,9	20,7	2,28	0,91	1,46	2,54	0,08	0,07
60	23,8	59,6	35,8	2,50	1,89	2,45	5,09	0,19	0,11
61	33,6	46,4	12,8	1,38	2,32	2,85	3,63	0,20	0,12
62	30,7	41,0	10,3	1,34	2,52	3,65	3,25	0,30	0,13
63	17,5	33,3	15,8	1,90	3,57	3,72	4,38	0,76	0,20
64	8,6	13,1	4,5	1,52	0,42	0,55	0,60	0,03	0,04
65	38,7	90,1	51,4	2,33	9,10	3,69	4,64	0,87	0,09
69	45,7				5,37	3,09		0,36	0,09

Patientennummer	LH basal in mU/ml	LH 130' p.stim. in mU/ml	LH 160' p.stim. in mU/ml	Quotient LH 30' p.stim. / LH basal	FSH basal in mU/ml	FSH 30' p.stim. in mU/ml	FSH 60' p.stim. in mU/ml	Quotient FSH 30' p.stim. / FSH basal	Quotient LH basal / FSH basal	Quotient LH 30' p.stim. / FSH 30' p.stim.
1	3,4	16,4	11,8	4,82	8,3	12,5	13,2	1,51	0,41	1,31
2	3,7	8,3	7,2	2,24	6,7	7,9	7,8	1,18	0,55	1,05
3	2,3	9,2	6,5	4,00	4,4	5,5	5,9	1,25	0,52	1,67
4	6,4	15,8	11,5	2,47	11,2	13,4	12,6	1,20	0,57	1,18
5	3,9	13,8	10,5	3,54	4,8	6,2	6,1	1,29	0,81	2,23
6	3,9	8,8	7,5	2,26	5,5	6,5	6,5	1,18	0,71	1,35
7	3,4	10,3	7,5	3,03	7,4	10,5	11,1	1,42	0,46	0,98
8	3,0	12,1	10,5	4,03	5,1	6,9	6,8	1,35	0,59	1,75
10	3,3	13,5	11,3	4,09	5,3	7,4	7,6	1,40	0,62	1,82
11	10,1	31,2	27,6	3,09	5,7	7,3	7,4	1,28	1,77	4,27
12	0,5	0,5	0,5	1,00	3,8	5,0	4,8	1,32	0,13	0,10
13	3,5	10,9	8,7	3,11	5,7	7,5	7,6	1,32	0,61	1,45
14	3,3	10,8	7,5	3,27	5,7	7,5	7,7	1,32	0,58	1,44
15	5,5	11,4	8,4	2,07	7,9	9,0	10,2	1,14	0,70	1,27
16	4,5	15,2	12,2	3,38	4,1	5,2	5,2	1,27	1,10	2,92
17	2,3	11,1	8,6	4,83	4,6	6,6	6,8	1,43	0,50	1,68
18	2,8	13,1	9,7	4,68	2,3	3,4	3,3	1,48	1,22	3,85
19	6,2	46,0	41,2	7,42	4,0	6,8	8,3	1,70	1,55	6,76
20	2,6	4,2	3,3	1,62	4,3	4,7	4,4	1,09	0,60	0,89
21	4,0	9,3	7,1	2,33	3,5	4,7	4,5	1,34	1,14	1,98
22	3,2	11,6	8,6	3,63	4,1	5,6	5,8	1,37	0,78	2,07
23	8,1	29,9	25,1	3,69	6,0	7,8	7,9	1,30	1,35	3,83
24	4,4	20,9	15,9	4,75	4,9	6,6	6,6	1,35	0,90	3,17
25	2,4	9,7	7,3	4,04	5,8	7,9	7,7	1,36	0,41	1,23
26	1,9	7,3	5,1	3,84	4,2	6,9	6,4	1,64	0,45	1,06
27	2,5	11,1	8,3	4,44	4,5	8,0	7,5	1,78	0,56	1,39
28	1,7	4,7	4,6	2,76	3,0	3,4	3,7	1,13	0,57	1,38
29	3,0	11,1	9,8	3,70	3,0	4,3	4,7	1,43	1,00	2,58
30	1,9	9,3	7,6	4,89	3,8	5,6	5,9	1,47	0,50	1,66
31	2,5	17,4	12,1	6,96	3,0	5,3	5,4	1,77	0,83	3,28
32										
33	8,1	26,0	18,7	3,21	5,4	6,7	6,6	1,24	1,50	3,88
34	3,8	12,3	9,7	3,24	3,1	4,1	4,4	1,32	1,23	3,00
35	5,0	17,1	13,1	3,42	2,9	3,8	3,8	1,31	1,72	4,50
37	5,8		58,2		5,7	16,8	17,5	2,95	1,02	5,07
38	4,5				7,4	14,8	15,1	2,00	0,61	2,73
39	2,5	8,8	6,4	3,52	3,7	4,9	4,9	1,32	0,68	1,80
40	4,0	17,0	12,8	4,25	4,5	7,1	7,1	1,58	0,89	2,39
41	6,3	28,4	21,4	4,51	4,6	5,9	6,0	1,28	1,37	4,81
42	7,3				4,1	13,1	14,2	3,20	1,78	5,88
43	2,8	7,8	5,4	2,79	5,7	6,9	7,1	1,21	0,49	1,13
45	2,5	7,1	8,7	2,84	5,9	6,9	6,8	1,17	0,42	1,03
46	13,3	41,4	30,1	3,11	4,6	6,1	6,0	1,33	2,89	6,79
47	4,1	10,3	7,5	2,51	5,0	6,5	6,3	1,30	0,82	1,58
48	2,0	11,1	7,1	5,55	4,4	6,5	6,4	1,48	0,45	1,71
49	2,1	8,1	5,9	3,86	6,7	8,3	8,2	1,24	0,31	0,98
50	1,1	10,7	8,2	9,73	3,5	4,9	5,2	1,40	0,31	2,18
51	4,5	12,5	9,5	2,78	4,2	5,3	5,2	1,26	1,07	2,36
52	4,4	18,9	13,8	4,30	5,0	7,5	7,3	1,50	0,88	2,52
53	2,5	6,5	5,0	2,60	3,3	4,0	4,0	1,21	0,76	1,63
54	3,0	9,6	7,9	3,20	6,1	7,1	7,2	1,16	0,49	1,35
55	12,6	48,5	36,8	3,85	8,3	13,1	13,8	1,58	1,52	3,70
57	2,3	8,9	6,9	3,87	6,0	7,5	7,6	1,25	0,38	1,19
58	4,8	15,0	10,8	3,13	4,6	6,0	6,0	1,30	1,04	2,50
59	7,9	36,1	28,8	4,57	5,3	6,6	6,9	1,25	1,49	5,47
60	2,3	6,5	5,3	2,83	7,9	10,8	11,2	1,37	0,29	0,60
61	3,0	8,1	5,1	2,70	1,9	2,5	2,4	1,32	1,58	3,24
62	2,1	6,0	4,3	2,86	4,6	6,0	5,8	1,30	0,46	1,00
63	4,6	18,3	13,1	3,98	3,5	5,0	4,9	1,43	1,31	3,66
64	11,8				4,5	7,6	7,7	1,69	2,62	10,61
65	1,1	3,5	2,5	3,18	4,0	5,2	5,0	1,30	0,28	0,67
69	9,0	26,9	22,3	2,99	5,4	6,5	6,4	1,20	1,67	4,14

Patientennummer	Blutglukose in mg/dl	Insulin in $\mu$ U/ml	IGF-1 in ng/ml	Leptin in ng/ml	VEGF in pg/ml
1	98	6,9	189	6,8	9,5
2	95	10,7	188	11,7	9,0
3	98	13,4	147	12,3	9,7
4	92	6,3	110	5,0	9,0
5	95	9,0	161	4,7	9,0
6	105	13,7	171	17,3	9,0
7	75	6,6	210	11,5	9,0
8	110	7,6	87	20,7	17,8
10	82	2,5	137	9,0	52,3
11		15,5	167	25,3	9,0
12	97	14,6	156	15,7	9,3
13	93	15,5	187	18,0	17,4
14		4,1	132	2,2	9,0
15	78	9,5	169	11,2	10,4
16		8,2	107	15,9	9,0
17	121	9,6	186	12,5	20,4
18	90	9,2	353	7,7	9,0
19	88	13,8	159	21,7	9,0
20		6,6	131	10,1	25,3
21	79	5,4	120	3,4	9,0
22	100	5,2	149	12,8	9,0
23	107	10,7	125	4,2	9,0
24		6,2	145	9,9	17,3
25		21,1	190	10,2	39,5
26	111	23,3	248	17,8	9,0
27	83	3,2	103	3,1	9,0
28			173	29,6	12,4
29			122	26,0	9,0
30	91	16,7	130	20,4	33,8
31	100	11,9	149	20,8	15,4
32				14,4	
33	87	6,0	239	12,7	9,0
34	107	7,3	47	17,5	9,0
35	101	1,8	134	7,9	11,1
37	104	8,5	226	10,2	9,0
38	119	10,2	137	46,2	9,0
39	102	12,0	148	18,4	37,0
40	98	7,5	166	3,0	9,0
41	85	7,4	177	8,4	9,0
42	103	11,0	189	30,1	9,0
43	106	14,6	198	34,1	13,1
45	90	7,7	169	8,6	9,0
46	99	7,5	148	10,1	9,0
47	101	9,1	238	10,4	23,8
48	95	7,1	187	9,8	9,0
49		10,0	162	3,8	12,1
50	88	10,8	176	27,0	17,5
51	109	16,4	229	15,8	9,0
52	90	3,2	168	12,7	9,0
53	87	9,8	184	11,3	9,0
54	100	9,1	167	9,2	17,2
55	98	18,3	150	48,5	47,1
57	97	10,4	210	7,7	9,0
58	95	5,7	162	12,2	15,8
59	92	9,7	198	7,3	9,0
60	84	5,0	173	11,4	9,0
61	100	9,6	222	3,5	9,0
62	105	13,9	236	29,1	9,0
63	92	7,5	214	6,8	16,2
64	94	6,4	174	3,8	9,5
65	107	22,4	199	22,3	16,3
69	108	10,9	101	41,4	9,0

### Tabelle A.1 - Verteilung der Polymorphismen

Tab.A.1: Verteilung der detektierten Polymorphismen bei den einzelnen Patientinnen (x = heterozygote Form, xx = homozygote Form).

Pat	Gr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	1	xx		xx		xx		xx		A/ G		A A	xx	xx	x						xx		xx
2	1	xx		xx		xx	xx			C/ G		A A	xx	xx	x		x	xx				xx	xx
3	1	xx			x	xx	xx	xx		C/ A		A A	xx	xx							xx	xx	Xx
4	1	xx				xx	xx	xx					xx	xx							xx	xx	Xx
5	1					x	xx					A/ C	x								xx		x
6	1							xx				A A							xx	xx			
7	1	xx	x			xx	xx	xx	x	C/ A		A A		x							xx	xx	xx
8	1						xx	xx		C/ A		A/ C	xx	xx							xx		x
10	1	xx				xx	xx	xx				A A		xx	x	x	x		x		xx	xx	xx
11	3	xx	x	x	x	xx	xx			C/ A		A A	xx	x	x			x		x	xx	xx	xx
12	3	x					xx	xx				A/ C	x			x	x			x	xx	x	x
13	3	xx		x	xx	xx	xx			A A		A A	xx	x								xx	xx
14	3							xx				A/ C								xx	xx		
15	3						x					A A	x								xx		
16	3	xx	x	x	x	xx	xx	xx				A/ C	xx			x	x					xx	xx
17	3	x					xx	xx		A/ C		A A	x	x						xx	xx	x	x
18	2						xx									x	x					x	x
19	2	xx	x	xx	x	x	x	xx				A/ C	x							x	x	x	x

TABELLE A.1.

20	2	xx		x		xx	xx	xx	x	A/ C		A/ C		xx				x			xx		
21	2	x					xx	xx						x						x	xx	x	x
22	2	xx					xx					A A	x								xx	xx	xx
23	2											A/ C									xx		
24	2							xx				A A								x	xx	x	x
25	2						x					A/ C	x	x							xx		
26	2							xx				A A									xx	x	x
27	2						x										x				xx	x	x
28	2				x		xx	xx				A/ C	x								xx	x	x
29	2													x							xx	x	x
30	2	xx			x	xx	xx						xx	xx							xx	xx	xx
31	2	xx	x	x		xx	xx					A/ C	x		x			x			xx	xx	xx
32	2	x						xx				A/ C	x								xx	x	x
33	2	x						xx				A/ C	x		x	x	x				xx	x	x
34	2	xx	xx	xx		x	xx					A/ C	x		x						xx	x	x
35	3						x						x	x							xx	x	x
37	3	x					x					A/ C	x		x			x		x	xx	x	x
38	1	xx	x	x	x	x	x	xx				A/ C	x								xx	x	x
39	1						xx	x				A/ C								x	xx		
40	1	xx	x		xx	xx	xx	xx				A/ C	xx								xx	xx	xx
41	2	x					x	xx		C/ A		A A	x	xx						xx	xx	x	x
42	2				x	x	xx	xx						x						x	xx	x	x
43	3																				xx		
45	1	x					x					A/ C	x	x							xx	x	x

TABELLE A.1.

46	3	xx	x	x	x	xx	xx	xx				C/ G	xx			x	x				xx	xx	xx
47	3	xx				xx	xx					A/ C	xx			x	x				xx	xx	xx
48	1							xx				A/ C									xx	x	x
49	1	xx	x	x		xx	x					A/ C	xx	x							xx	xx	xx
50	1	x		x			x					A A	x								xx	x	x
51	2		x	xx			x	xx				A/ C		x	x			x			xx	x	x
52	1	x				x	xx						x	x							xx	x	x
53	1				x	x	x	xx		C/ A		A/ C	x	x			x				xx	x	x
54	1	xx	x	x	x	xx	xx	xx				A/ C	xx	x							xx	xx	xx
55	2	xx	x			xx	xx					A A	xx		x			x			xx	xx	xx
57	1	xx				xx	xx	xx					xx	x		x	x				xx	xx	xx
58	3					x	xx					A/ C	x								xx	x	x
59	3	xx	x	x	xx	xx	xx	xx		C/ A		A A	xx	x		x					xx	xx	xx
60	1	xx				xx	xx	xx					xx	x		x	x				xx	xx	xx
61	1	x		x			xx	xx				A/ C	xx	xx			x	x			xx	xx	xx
62	3						x	xx				A A								x	x	x	
63	1	x		x			x	xx				A A	x								x	x	x
64	3	xx		x		xx	xx	x				A A	xx		x		x				xx	xx	xx
65	2	xx			xx	xx	xx	xx		A A	x	A A	xx	xx						x	xx	xx	xx
69	3	xx		x	x	xx	xx			C/ A			xx	xx	x		x	x			xx	xx	xx